

Faculdade de Engenharia Química

Área de Concentração: Desenvolvimento de Processos

Biotecnológicos

Encapsulamento em Lipossomas de Proteínas Individuais e em Misturas Simulando Extratos Alergênicos

Igor Ricardo de Souza Victorino

Autor

Prof^a Dra. Maria Helena Andrade Santana

Orientadora

Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner

Co-Orientador

Dissertação submetida à comissão de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Engenharia Química

Campinas - SP

Junho, 2000

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T/Unico
V. 666e	
V.	Ex.
TOMBO BC/	43567
PROC.	16-392101
C <input type="checkbox"/>	D <input checked="" type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00
DATA	02/02/01
N.º CPD	

CM-00153672-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

V666e

Victorino, Igor Ricardo de Souza

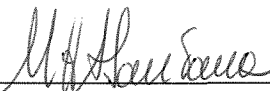
Encapsulamento em lipossomas de proteínas individuais
e em misturas simulando extratos alergênicos / Igor
Ricardo de Souza Victorino.--Campinas, SP: [s.n.], 2000.

Orientadores: Maria Helena Andrade Santana, Ricardo de
Lima Zollner

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Lipossomos. 2. Adjuvantes imunológicos. 3.
Alergenos. 4. Proteínas. 5. Peptídios. I. Santana, Maria
Helena Andrade. II. Zollner, Ricardo de Lima. III.
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Engenharia Química. IV. Título.

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada em 02 de junho de 2000 pela banca examinadora constituída pelos professores doutores:



Prof.ª Dr.ª Maria Helena Andrade Santana
Orientadora



Prof. Dr. Ricardo de Lima Zollner
Co-orientador



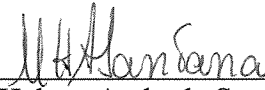
Prof.ª Dr.ª Dirce Mithico Yamaoka Yano



Dr.ª Terezinha Célia de Almeida e Silva Zollner

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Esta versão corresponde a redação final da Tese de Mestrado em Engenharia Química defendida pelo Engenheiro Igor Ricardo de Souza Victorino e aprovada pela Comissão julgadora em 02 de junho de 2000.



Prof^ª. Dr^ª. Maria Helena Andrade Santana
Orientadora

Aos meus pais, irmãos, esposa, sobrinhos e amigos queridos

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Agradecimentos

O desenvolvimento e execução deste trabalho está ligado firmemente ao apoio e incentivo de muitas pessoas, que participaram ativamente e que me orgulho de poder tê-las como companheiros.

Aos meus pais, Eldio e Regina que em todos os momentos difíceis que passamos estavam sempre ao meu lado, me motivando a conquistar uma vida, a viver, mas o melhor que sempre me passaram, foi o saber viver.

À minha bela e querida esposa Veronica, por todo carinho, amor, paciência, dedicação, respeito e incentivo que nunca lhe faltaram, principalmente nos momentos de mais dificuldades que passamos.

Aos meus irmãos Isabela e Flávio por sempre depositarem em mim a confiança de uma conquista, por sempre acreditarem em meu potencial.

Aos meus belos e queridos sobrinhos Carolina, Rafael, Ian e Adéli que foram sempre motivos de alegrias e descontração.

A todos meus familiares, tios e tias, primos e primas, avós e principalmente meus avôs, já falecidos, por acreditarem e orarem sempre por mim, pelo meu sucesso, minha vitória. Obrigado de coração.

Em especial, a minha professora orientadora Dra. Maria Helena Andrade Santana pela compreensão, ajuda, respeito, pela orientação científica e muita confiança em meu potencial, principalmente nos momentos de desânimo e dificuldades. Agradeço de coração a minha aceitação.

Ao meu professor co-orientador Dr. Ricardo de Lima Zollner que contribuiu em todos os momentos, com conhecimentos novos fora de minha área de atuação, com paciência, respeito, amizade.

À professora Dra. Terezinha Zollner, orientando-me em todos seus conhecimentos relativos ao trabalho, pelo respeito, pela colaboração nas análises e por proporcionar um ambiente de trabalho alegre e entusiástico.

Ao professor Dr. Cesar Costapinto Santana pela cessão das dependências dos Laboratórios de Biosseparação.

A todos meus amigos que fizeram parte da minha turma e professores que participaram das disciplinas cursadas, em especial ao João Batista, ao Adriano, à Cláudia, ao César Acconci, ao Basilino Barbosa, ao Alessandro Ribas, à Laura, à Cristina, ao Iraí, Aos amigos de outros departamentos, especialmente, ao João Vicente, Marcone, Eduardo (Ursão), José Wilson, Alex (Velho), Marlus, Everaldo, Cristiano, Roberto, Rafael (Estagiário), Luis Meleiro (Tricolor) a todas as pessoas que estiveram sempre ao meu lado desde o início que cheguei a UNICAMP.

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos (Heron, à Fernanda, Oselys, Maria Helena, Elaine, Paulo de Tarso, Carla e a Samantha) devido ao companheirismo, amizade e muito profissionalismo.

A todos os colegas do Departamento de Processos Biotecnológicos que participaram com alguma forma contribuindo no desenvolvimento do trabalho.

À CAPES, pela concessão da Bolsa de Estudos e apoio financeiro ao trabalho realizado.

E a todos que de alguma maneira estiveram ao meu lado contribuindo e participando dessa longa e difícil etapa. Muito Obrigado.

"Deus está em toda parte ao mesmo tempo, em redor de você, dentro de você! Jamais estamos desamparados. Nunca estamos sós. Não permitamos que a mágoa nos perturbe: procuremos nos manter calmos, para ouvir a voz silenciosa de Deus dentro de nós. É assim que superaremos todas as dificuldades que aparecerem em nossos caminhos e havemos de descobrir todas as verdades que existem em todas as coisas e pessoas".

(C.Torres Pastorino)

"As grandes edificações, a que presidem a autoridade e a força, não recebem de seus autores os esmeros de arte".

(Rui Barbosa)

"O amor do cachorro é a coisa mais próxima de Deus".

(Carlos Heitor Cony)

"Os miseráveis não têm outro remédio a não ser a esperança".

(William Shakespeare)

"O homem desperta e sai, cada alvorada, para o acaso das coisas...E, à saída leva uma crença vaga, indefinida, de achar o Ideal nalguma encruzilhada..."

(Raul de Leoni)

"Diga a verdade e saia correndo".

(Provérbio Iugoslávio)

"Resistência faz parte da evolução, é preciso romper a resistência com persistência e autodecisão. Auto-iniciar, autoconhecer, auto-realizar. São os remos da evolução".

(Suely Braz Costa)

Sumário

Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Tabelas.....	xxiii
Lista de Abreviações.....	xxv
Nomenclatura.....	xxvii
Resumo.....	xxix
Abstract.....	xxxix
.	
Capítulo I - Introdução e Objetivos.....	1
1.0 – Introdução	1
1.1 - Objetivos.....	2
Capítulo II - Revisão Bibliográfica.....	4
2.0 – Revisão Bibliográfica.....	4
2.1 – Estrutura, Composição e Função dos Lipossomas.....	4
2.2 – Classificação dos Lipossomas.....	7
2.3 – Influência do Método de Preparação no Tipo de Lipossoma.....	9
2.4 – Influência das Propriedades dos Lipídios na Estrutura de seus Agregados.....	11
2.5 – Preparação dos Lipossomas pelo Método de Hidratação do Filme Seco de Lipídios.....	14
2.6 – Métodos de Caracterização dos Lipossomas.....	15

2.7 – Tipos e Indução de Resposta Imunológica.....	16
2.8 – Lipossomas como Imunoadjuvantes.....	20
2.9 - Estabilidade dos Lipossomas em Presença de Tensoativos.....	35
2.10 - Comportamento dos Lipossomas "In Vivo".....	36
2.11 - Aspectos Relevantes das Proteínas Encapsuladas.....	39
 Capítulo III - Material e Métodos.....	 42
3.0 – Material e Métodos.....	42
3.1 – Material.....	42
3.2 – Equipamentos.....	43
3.3 – Métodos Experimentais.....	45
3.3.1 – Coeficiente de Partição das Proteínas.....	45
3.3.2 – Preparação dos Lipossomas.....	46
3.3.2.1 – Método de Hidratação do Filme Seco de Lipídios.....	46
3.3.2.2 – Homogeneização dos Lipossomas.....	47
3.3.3 – Separação dos Lipossomas das Proteínas não Encapsuladas.....	47
3.3.3.1 – Cromatografia por Permeação em Gel.....	47
3.3.3.2 – Ultrafiltração.....	48
3.3.4 – Caracterização dos Lipossomas.....	49
3.3.4.1 – Determinação do Teor de Fosfolipídios.....	49
3.3.4.2 – Determinação do Raio Hidrodinâmico e Distribuição de Tamanhos dos Lipossomas.....	50
3.3.5 – Determinação da Concentração de Proteínas.....	51
3.3.5.1 – Método do Ácido Bicincônico (BCA).....	51
3.3.5.2 – Método de Lowry Modificado – Ensaio Hartree.....	52
3.3.5.3 – Determinação da Concentração das Proteínas Encapsuladas.....	53
3.3.6 – Estabilidade de Liposomas em Tensoativo não Iônico e em Plasma Humano.....	54

3.3.7 – Análise Qualitativa das Proteínas Encapsuladas.....	56
3.3.8 – Associação das Proteínas em Mistura à Superfície dos Lipossomas.....	57
Capítulo IV - Resultados e Discussão.....	59
4.0 – Resultados e Discussão.....	59
4.1 – Coeficiente de Partição das Proteínas no Sistema Octanol/Água.....	59
4.2 – Rendimentos na Preparação dos Lipossomas.....	60
4.3 – Separação dos Lipossomas das Proteínas não Encapsuladas.....	60
4.3.1 – Influência do Gel na Separação de Lipossomas Unilamelares (SUV's) da Proteína Albumina de Soro Bovino (BSA).....	60
4.3.2 – Comparação da Eficiência de Separação e Recuperação das Proteínas Individuais e Misturas pelas Técnicas de Permeação em Gel e Ultrafiltração.....	62
4.4 – Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanhos dos Lipossomas.....	64
4.4.1 – Lipossomas Unilamelares (SUV's).....	64
4.4.2 - Lipossomas Multilamelares (MLV's).....	65
4.5 – Encapsulamento de Proteínas Individuais e em Misturas.....	65
4.5.1 – Perfis de Encapsulamento da Albumina de Soro Bovino (BSA) em Lipossomas Unilamelares (SUV's) e Multilamelares (MLV's).....	66
4.5.2 – Influência do Peso Molecular no Encapsulamento Individual de Proteínas em Lipossomas Multilamelares (MLV's).....	70
4.5.3 – Encapsulamento de Misturas de Proteínas em Lipossomas Multilamelares (MLV's).....	73
4.5.4 – Comparação entre o Encapsulamento das Proteínas Individuais e Misturas em Lipossomas Multilamelares (MLV's).....	77
4.6 – Estabilidade de Lipossomas Encapsulando Proteínas Individuais e Misturas de Proteínas em Tensoativo não Iônico C ₁₂ E ₅ e em Plasma Humano.....	78

4.6.1 – Estabilidade de Lipossomas Encapsulando Proteínas Individuais em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$	79
4.6.1.1 – Estabilidade de Lipossomas Unilamelares (SUV's) e Multilamelares (MLV's) Encapsulando Albumina de Soro Bovino (BSA) em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$	79
4.6.1.2 – Estabilidade de Lipossomas Multilamelares (MLV's) Encapsulando Mioglobina (Mio) em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$	80
4.6.1.3 - Estabilidade de Lipossomas Multilamelares (MLV's) Encapsulando Citocromo C (Cit C) em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$	81
4.6.1.4 - Estabilidade de Lipossomas Multilamelares (MLV's) Encapsulando Misturas de Proteínas em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$	82
4.6.2 - Estabilidade de Lipossomas Multilamelares (MLV's) Encapsulando Misturas de Proteínas em Plasma Humano.....	84
4.7 – Análise Qualitativa das Proteínas Encapsuladas a partir de suas Misturas.....	86
4.8 - Associação das Proteínas em Mistura à Superfície dos Lipossomas.....	87
Capítulo V - Conclusões e Sugestões.....	89
5.0 – Conclusões e Sugestões.....	89
5.1 - Conclusões.....	89
5.2 - Sugestões.....	90
Capítulo VI - Referências Bibliográficas.....	91
6.0 –Referências Bibliográficas.....	91
Apêndice.....	101

Lista de Figuras

- Figura 1 – Estrutura dos lipossomas com as moléculas de fosfolipídios agregadas formando a bicamada lipídica e o núcleo central aquoso das vesículas. Nessa estrutura as moléculas hidrofílicas encapsuladas localizam-se no núcleo aquoso (cor amarela) ou estão associadas às cabeças polares dos fosfolipídios na face interna ou externa da bicamada (cor púrpura). Moléculas hidrofóbicas localizam-se na bicamada lipídica (cor azul), e as moléculas com características anfífilas situam-se entre as partes hidrofílica e hidrofóbica da estrutura (cor verde). (Adaptada de Lasic, 1993)..... 5
- Figura 2 - Estrutura da molécula de fosfolipídio composta de cabeça polar e região apolar formada de cadeias de hidocarbonetos saturadas e insaturadas (a). Grupos hidrofílicos que constituem a cabeça polar dos fosfolipídios usados na preparação de lipossomas (b)..... 6
- Figura 3 - Classificação dos lipossomas quanto à morfologia, tamanho e número de lamelas. SUV-Vesícula Unilamelar Pequena, LUV-Vesícula Unilamelar Grande, MLV-Vesícula Multilamelar, MVV-Vesícula Multivesicular, OLV -Vesícula Oligolamelar (Adaptada de Crommelin e Schreier, 1994)..... 8
- Figura 4 - Forma de agregação das moléculas de lipídios (fosfolipídios) de acordo com o parâmetro geométrico P . Este parâmetro depende do tipo de lipídio, das misturas dos mesmos, dos grupos funcionais pertencentes às cabeças polares e também das cadeias de acilas..... 12
- Figura 5 - Influência da temperatura de preparação das bicamadas lipídicas no estado de agregação das cadeias acila. Acima da temperatura de transição de fases, T_c , as cadeias acila são mais livres para movimentarem-se caracterizando o estado cristal líquido-fluido. Abaixo da temperatura de transição de fases as cadeias acila possuem movimentos limitados que caracterizam o estado gel-sólido..... 13

Figura 6 - Formação dos lipossomas multilamelares pela hidratação do filme seco de lipídios. As linhas indicam as bicamadas de fosfolipídios (Adaptado de Lasic, 1993)..... 15

Figura 7 - Esquema de indução das respostas imunológicas. Os imunógenos e os antígenos neste caso, podem ser os lipossomas encapsulando alguma proteína ou droga (Adaptada de Stites e Terr, 1991)..... 19

Figura 8 - Atuação dos lipossomas no sistema imunológico, envolvendo os dois tipos de respostas imune, humorais e mediada por células ou celulares. As respostas imunes são dependentes do tipo de antígeno que esteja presente (Adaptada de Frézard, 1999).... 35

Figura 9 – Molécula de BSA. (a) Hastes helicoidais de densidade de 8 a 10 Å em diâmetro, indicativo da estrutura α -helicoidal (características dominantes da densidade eletrônica). (b) Estrutura secundária, possuindo 28 hélices tendo de 5 a 31 aminoácidos em comprimento podendo ser agrupados em dentro de 10 hélices principais dentro de cada domínio. (c) Modelo espacial da molécula de BSA, com os resíduos básicos em azul, resíduos ácidos em vermelho e os neutros em amarelo..... 39

Figura 10 – Molécula de Mioglobina. As bases polipeptídicas são mostradas nas fitas (estrutura secundária), As regiões α -helicoidais são evidentes. (b) Modelo espacial (tridimensional) mostrando os grupos heme escondidos (em vermelho), todas as cadeias de aminoácidos estão incluídas. (c) A representação das tiras incluindo as cadeias laterais (roxo) para os resíduos hidrofóbicos Leu, Ile, Val, e Phe. (d) Modelo espacial com todas as cadeias laterais de aminoácidos, os resíduos hidrofóbicos estão mostrados em roxo, mas muitos não são visíveis por estarem escondidos no interior da proteína..... 40

- Figura 11 – Molécula de Citocromo C. Duas representações são mostradas: a representação em tiras espirais (a) e o modelo espacial (b). Nas representações em tiras as estruturas β estão representadas por setas planas e a α -hélice na forma de tiras espirais, a orientação em cada caso é a mesma..... 41
- Figura 12 - Placa para o ensaio de estabilidade, e a disposição das soluções de tensoativo nas várias concentrações. A designação br refere-se aos brancos tomados como referência, nos quais os lipossomas foram substituídos por água..... 55
- Figura 13 - Perfil de eluição para a separação da proteína BSA não encapsulada de lipossomas unilamelares (SUV's) pela técnica de cromatografia de permeação em gel (com o gel Sephadex G-100)..... 61
- Figura 14 - Perfil de eluição para a separação da proteína BSA não encapsulada de lipossomas unilamelares (SUV's) pela técnica de cromatografia de permeação em gel (com o gel Sepharose CL-6B)..... 61
- Figura 15 - Perfis de encapsulamento da proteína BSA em lipossomas unilamelares (SUV's) e multilamelares (MLV's) de razão molar 70:30 de DSPC:Col. As razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ são referentes as razões (P/L) medidas antes e após os processos de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas..... 66
- Figura 16 – Perfis de eficiências de encapsulamento da proteína BSA em lipossomas unilamelares (SUV's) e multilamelares (MLV's) de razão molar 70:30 de DSPC:Col. As razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ são referentes as razões (P/L) medidas antes e após os processos de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas..... 67

Figura 17 - Perfis de encapsulamento das proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C encapsuladas individualmente a várias razões (P/L) inicial e final em lipossomas multilamelares (MLV's) de razão molar 70:30 (DSPC:Col). As razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ são referentes as razões (P/L) medidas antes e após os processos de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas..... 70

Figura 18 – Perfis de eficiências de encapsulamento de lipossomas multilamelares com razão molar 70:30 (DSPC:Col) encapsulando as proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C individualmente a várias razões (P/L) inicial. As proteínas BSA e Mioglobina possuem perfis semelhantes..... 71

Figura 19 - Perfil de encapsulamento das proteínas em misturas 1 e 2 de composições molares (20:40:40), (40:20:40) e (40:40:20) Cit C:Mio:BSA respectivamente, em função das razões Proteína/Lipídio inicial. As razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ são referentes as razões (P/L) medidas antes e após os processos de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas..... 73

Figura 20 - Perfil de eficiência de encapsulamento das proteínas em misturas 1 e 2 de composições molares 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 de Cit C:Mio:BSA respectivamente, em função das razões Proteína/Lipídio inicial..... 74

Figura 21 - Comparação entre os perfis de encapsulamento das proteínas individuais e em mistura (1 e 2) com proporções molares: (20:40:40), (40:20:40) e (40:40:20) Cit C:Mio: BSA respectivamente, em função da razões Proteína/Lipídio inicial. As razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ são referentes as razões (P/L) medidas antes e após os processos de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas..... 77

Figura 22 - Comparação entre os perfis de eficiências de encapsulamento das proteínas individuais e em mistura (1 e 2) com proporções molares: 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 de Cit C:Mio:BSA respectivamente, em função das razões Proteína/Lipídio inicial..... 78

Figura 23 - Estabilidade de lipossomas unilamelares (SUV's) e multilamelares (MLV's) encapsulando a proteína BSA em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ em função das razões (P/L) final..... 79

Figura 24 - Estabilidade de lipossomas multilamelares (MLV's) encapsulando a proteína Mioglobina em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ em função das razões (P/L) final.. 80

Figura 25 - Estabilidade de lipossomas multilamelares encapsulando a proteína Citocromo C em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ em função das razões (P/L) final. Foram analisados três amostras com razões $(P/L)_{\text{final}}$ de $2,72 \cdot 10^{-5}$, $2,36 \cdot 10^{-4}$ e $2,87 \cdot 10^{-4}$ respectivamente..... 81

Figura 26 - Estabilidade de lipossomas multilamelares encapsulando misturas de proteínas (tipo 1) (concentração total da solução de hidratação de 1,36 mg/mL) em tensoativo não iônico em $C_{12}E_5$. Foram utilizadas as misturas com proporções molares de: 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 referentes à Cit C:Mio:BSA..... 82

Figura 27 - Estabilidade de lipossomas multilamelares encapsulando misturas de proteínas (tipo 2) (concentração total da solução de hidratação de 3,50 mg/mL) em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$. Foram utilizadas as misturas com proporções molares de: 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 referentes à Cit C:Mio:BSA..... 83

Figura 28 - Estabilidade de lipossomas multilamelares em plasma humano encapsulando misturas de proteínas (tipo 1) (concentração total da solução de hidratação de 1,36 mg/mL). Foram utilizadas as misturas com proporções molares de: 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 referentes à (Cit C:Mio:BSA).....	84
Figura 29 - Estabilidade de lipossomas multilamelares encapsulando a mistura de proteínas (tipo 1) com proporção 40:20:40, e $(P/L)_{\text{final}} 2,31 \cdot 10^{-4}$, em plasma humano durante 6 dias consecutivos. O ensaio foi realizado na temperatura média de 33 °C. O plasma foi diluído em tampão HEPES 10mM e pH 7,4.....	85
Figura 30 - Eletroforese SDS-PAGE das misturas de proteínas que foram encapsuladas em lipossomas multilamelares após rompimento com Triton X-100. As faixas 1, 2 e 3 representam as misturas de proteínas com composições molares de 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 referentes à Cit C:Mio: BSA respectivamente.....	86
Figura 31 – Eletroforese SDS-PAGE da amostra de lipossomas multilamelares com a superfície modificada com mistura de proteínas (concentração de hidratação total de 1,36 mg/mL) com proporções molares de 40:20:40 referentes à de Cit C:Mio:BSA.....	88
Figura A.1 – Curva de calibração para o ensaio fosfato.....	101
Figura A.2a – Curva de calibração da proteína BSA com ácido bicincônico.....	102
Figura A.2b – Curva de calibração da proteína BSA (Método de Lowry-Modificado).....	102
Figura A.2c – Curva de calibração da proteína Mioglobina (Método de Lowry-Modificado).....	103
Figura A.2d – Curva de calibração da proteína Citocromo C (Método de Lowry-Modificado).....	103

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Faixas de diâmetros das vesículas pertencentes aos vários tipos de lipossomas. (Adaptada de Barenholz e Crommelin,1994).....	9
Tabela 2 - Métodos de preparação de lipossomas e os diferentes tipos de vesículas obtidos. (SUV) - vesícula unilamelar pequena; (LUV) – vesícula unilamelar grande; (MLV) - vesícula multilamelar; (OLV) - vesícula oligolamelar. (Adaptada de Crommelin e Schreier,1994).....	10
Tabela 3 - Proteínas - padrão usadas como marcadores de peso molecular na eletroforese.....	57
Tabela 4 - Partição das proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C no sistema: octanol/água.....	59
Tabela 5 - Recuperação da Proteína BSA através das técnicas de Cromatografia de permeação em Gel (sephadex G-100 e sepharose CL-6B e Ultrafiltração em membrana de policarbonato.....	63
Tabela 6 - Recuperação das proteínas não encapsuladas individuais e em misturas após ultrafiltração.....	63
Tabela 7 - Diâmetros médios de lipossomas unilamelares (SUV's) vazios e encapsulando a proteína BSA a várias razões molares Proteína/Lipídio final.....	64
Tabela 8 - Faixas de diâmetros das vesículas multilamelares encapsulando as proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C.....	65

Tabela 9a - Razões molares, $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$, e percentagens de encapsulamento para lipossomas unilamelares (SUV's) com composição molar 70:30 (DSPC:Col) encapsulando a proteína BSA à concentrações iniciais da solução de hidratação de 2,0 a 8,0 mg/mL.....	68
Tabela 9b - Razões molares, $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ e percentagens de encapsulamento para lipossomas multilamelares (MLV's) com composição molar 70:30 (DSPC:Col) encapsulando a proteína BSA à concentrações iniciais da solução de hidratação de 2,0 a 16,0 mg/mL.....	69
Tabela 10 - Razões (P/L) inicial e final, e percentagens de encapsulamento, referentes às proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C encapsuladas em MLV's.....	72
Tabela 11 - Razões (P/L) inicial e final e as percentagens de encapsulamento das misturas de proteínas com BSA, Mioglobina e Citocromo C. As soluções de hidratação possuem concentrações totais de: tipo (1) 1,36 mg/mL e tipo (2) 3,50 mg/mL respectivamente.....	76
Tabela A.3 - Dados referentes às soluções de hidratação das proteínas utilizadas no encapsulamento de lipossomas multilamelares.....	104

Lista de Abreviações

PC's: Fosfatidilcolinas
PE's: Fosfatidiletanolamina
PI: FosfatidilInositol
SPM: Esfingomielina
PG: Fosfatidilglicerol
PS: Fosfatidilserina
PA: Ácido Fosfatídico
PEG: Polietilenoglicol
MLV: Vesícula Multilamelar
OLV: Vesícula Oligolamelar
SUV: Vesícula Unilamelar Pequena
LUV: Vesícula Unilamelar Grande
GUV: Vesícula Unilamelar Gigante
MVV: Vesícula Multivesicular
REV: Vesículas Produzidas por Evaporação em Fase Reversa
SPLV: Vesículas Plurilamelares Estáveis
FATMLV (MLV): Congelamento e Descongelamento de MLV
VET: Vesículas Preparadas por Extrusão
FPV: Vesículas Preparadas por Prensa France
FUV: Vesículas Preparadas por Fusão
DRV: Vesículas Preparadas por Desidratação e Reidratação
BSV: Vesículas Preparadas por Borbulhamento de Gás Inerte
BSA: Albumina de Soro Bovino
OVA: Proteína Ovoalbumina (de ovos de galinha)
Myo (Mio): Mioglobina
Cyt C (Cit C): Citocromo C
HEPES: Tampão ((N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-[2-ácido etanosulfônico]]))

QLS: Espalhamento quase elástico de luz

IgM: Imunoglobulina tipo M (isotipo)

IgG: Imunoglobulina tipo G (isotipo)

IgE: Imunoglobulina tipo E (isotipo)

HDL: Lipoproteínas de alta densidade

DSPC: Fosfolipídio (L- α -distearoilfosfatidilcolina)

DMPC: Fosfolipídio Dimiristoilfosfatidilcolina

DMPE: Fosfolipídio Dimiristoilfosfatidiletanolamina

DMPG: Fosfolipídio Dimiristoilfosfatidilglicerol

DLPC: Fosfolipídio Dilinoleoilfosfatidilcolina

DOPC: Fosfolipídio Dioleoilfosfatidilcolina

DPPC: Fosfolipídio Dipalmitoilfosfatidilcolina

DPPE: Fosfolipídio Dipalmitoilfosfatidiletanolamina

MDP: N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina

COL (Chol): Colesterol

BCA: Ácido Bicincônico

APC (CPA): Célula Processadora de Antígeno

CPH: Complexo Maior de Histocompatibilidade Genética

RES: Sistema Retículo Endotelial

LTC: Linfócitos T Citotóxicos

C₁₂E₅: Polioxietileno 5 Lauril Éter

Ser, Thr, Asn, His, Leu, Ile, Val e Phe: Aminoácidos Serina, Triptofano, Arsenina, histidina, Leucina, Isoleucina, Valina e Phenina

Nomenclatura

P : Parâmetro de empacotamento

V : Volume molecular da parte hidrofóbica do fosfolipídio

A_0 : Área superficial ótima (área ocupada pela parte hidrofílica)

$\%E$ ($\%Enc$): Eficiência (Porcentagem) de encapsulamento

C_p : Coeficiente de partição

C_{p_i} : Concentração inicial de proteínas

C_{p_f} : Concentração de proteínas na fase aquosa

R_h : Raio hidrodinâmico (médio)

K : Constante de Boltzmann

T : Temperatura absoluta

D : Coeficiente de difusão translacional (médio da vsícula)

μ : Viscosidade do meio (solvente)

$\%C_{12}E_5$: Porcentagem de tensoativo

A : Absorbância a diferentes concentrações de tensoativos (medidas a 340 nm)

A_0 : Absorbância na concentração de tensoativo igual a zero

$Abs_{Normalizada}$: Absorbância normalizada calculada de acordo com a expressão (6)

(P/L): Razão Proteína/Lipídio

Resumo

Victorino Igor, R. S. Encapsulamento em Lipossomas de Proteínas Individuais e em Misturas Simulando Extratos Alergênicos. Tese (Mestrado)
Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000

Os lipossomas têm sido utilizados como imunoadjuvantes antigênicos, em estudos que enfatizam a sua atuação no sistema imunológico. Extratos peptídicos ou protéicos de várias fontes foram encapsulados em lipossomas ou associados à sua superfície, e aplicados em imunoterapias e vacinas. Apesar disso, poucos são os estudos voltados para a performance do processo de preparação desses lipossomas, eficiência da associação proteína/lipídio e estabilidade das vesículas.

Este trabalho trata da avaliação do encapsulamento das proteínas: Albumina de Soro Bovino (BSA), Mioglobina (Mio) e Citocromo C (Cit C), simulando extratos alergênicos provenientes de fungos e ácaros, no que se refere à faixa de peso molecular das suas proteínas. Os lipossomas foram preparados com os lipídios L- α -distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e Colesterol (Col) na razão molar 70:30 respectivamente. As proteínas foram encapsuladas individualmente e em forma de misturas de composições molares BSA:Mio:Cit C de 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20, respectivamente. Além disso, a mistura de proteínas de composição 40:20:40 (BSA:Mio:Cit C) foi também associada covalentemente à superfície das vesículas. Os lipossomas foram caracterizados pelo teor de fósforo e diâmetro médio. O desempenho do encapsulamento foi analisado através dos perfis e eficiências de encapsulamento das proteínas individuais e em misturas, além da estabilidade das vesículas em tensoativo penta etileno glicol mono-n-dodecil éter ($C_{12}E_5$), e de plasma humano. Para as misturas, analisou-se a exclusão de proteínas durante o encapsulamento e a associação à superfície dos lipossomas.

Os resultados indicam que a eficiência de encapsulamento depende mais das interações proteína:lipídio que do tamanho das proteínas. As eficiências de encapsulamento variaram entre 0,03% e 3,55% para as proteínas individuais e entre 1,04% e 3,94% para as misturas. Não houve alteração na estabilidade dos lipossomas em $C_{12}E_5$ com a presença das proteínas. Em plasma, essas vesículas permaneceram estáveis por aproximadamente 20 horas. Na associação à superfície dos lipossomas, predominou a presença de BSA em relação às outras proteínas.

Palavras-chave: lipossomas, encapsulamento, imunoadjuvantes, extratos alergênicos, proteínas e peptídios

Abstract

Victorino Igor, R. S. Encapsulamento em Lipossomas de Proteínas Individuais e em Misturas Simulando Extratos Alergênicos. Tese (Mestrado)
Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2000

Liposomes has been studied as antigenic immunoadjuvants with emphasis on their performance in the imunological system. Peptides or proteins of various sources were encapsulated in liposomes or associated to their surface, and applied in immunotherapy and vaccines. In spite of this, there are few studies about the performance of preparation process of these liposomes, efficacy of the association protein/lipid and the stability of vesicles.

This work concerns with the evaluation of the encapsulation of the proteins Bovine Serum Albumin (BSA), Myoglobin (Myo) and Cythochrome C (Cyt C), simulating allergen extracts from molds and mites, related to the range of molecular weight of their proteins. Liposomes were prepared with lipid L- α -disteraoylphosphatidylcholine (DSPC) and Cholesterol (Chol) at molar ratio 70:30 respectively. The proteins were encapsulated individually and in mixtures with molar composition BSA:Myo:Cyt C of 20:40:40, 40:20:40 and 40:40:20 respectively. Furthermore, the mixture 40:20:40 (BSA:Myo:Cyt C) was also covalently associated to the surface of vesicles. Liposomes were characterized by their phosphate contents and mean diameter. The performance of the protein encapsulation was evaluated through the profiles and efficiency of the encapsulation and throught the stability of vesicles in the presence of the surfactant penta ethylene glycol mono-n-dodecyl ether (C₁₂E₅) and human plasma. For the mixtures, the exclusion of proteins during entrapment or association to the liposome surface was also evaluated.

The experimental results indicate that the efficacy of encapsulation is more dependent of the interactions protein/lipid than the size of the proteins. The efficiencies of encapsulation changed between 0.03% and 3,55% for individual proteins and were between 1,04% and 3,94% for the mixtures. The presence of proteins does not altered the stability of liposomes in C₁₂E₅ . In human plasma the vesicles remained with stability about 20 hours. For the mixtures, the presence of the BSA protein predominated in the vesicles.

Key-words: liposomes, encapsulation, immunoadjuvants, allergenic extracts, proteins and peptides

Capítulo I – Introdução e Objetivos

1.0) Introdução

Lipossomas são vesículas lipídicas que atuam como veículos de liberação controlada de medicamentos, drogas, vitaminas, proteínas e peptídios.

Foram primeiramente descritos por Alec Banghan, em seu laboratório, na Inglaterra. Inicialmente a intenção era o conhecimento das propriedades físico-químicas e fisiológicas das membranas celulares. Através de uma dispersão de fosfolipídios em água, agitada manualmente, foi observada a formação de vesículas multilamelares onde cada lamela era constituída por uma bicamada de fosfolipídios estabilizadas por interações anfifílicas. A semelhança desse sistema com as membranas biológicas não só trouxe um excelente modelo para estudos das suas propriedades físico-químicas, como uma excelente perspectiva para aplicações na área médica. O desenvolvimento bem sucedido dos lipossomas em aplicações imunoterápicas, depende das formulações e da associação dos agentes ativos às vesículas. A seleção e composição dos fosfolipídios, o tamanho das vesículas, o método de incorporação dos agentes a serem encapsulados e as características finais do sistema são elementos fundamentais no desempenho dos lipossomas como imunoadjuvantes.

Os lipossomas possuem grande flexibilidade para o encapsulamento de moléculas hidrofílicas, hidrofóbicas ou anfifílicas e habilidade de atingir células específicas ou órgãos quando administrados "in vivo". As suas desvantagens estão associadas à estabilidade e capacidade de encapsulamento das moléculas de interesse. Em termos de processo de produção, as principais dificuldades são a estabilidade das vesículas, esterilidade e aumento de escala das preparações.

Vários estudos foram feitos com lipossomas encapsulando peptídios e proteínas, cuja ênfase foi dada aos efeitos imunológicos dos antígenos encapsulados. Muitas desses peptídios e proteínas eram característicos de vários tipos de bactérias, vírus e/ou extratos alergênicos provenientes de várias fontes. Atualmente os processos alérgicos desencadeados por diferentes agentes (fungos, ácaros, etc.), constituem um problema de

saúde pública e várias pesquisas vêm sendo realizadas no sentido do entendimento dos seus mecanismos para aprimoramento de terapias e controle de sua incidência.

Neste trabalho foi feito um estudo do processo de encapsulamento de proteínas-modelo simulando extratos alergênicos em lipossomas unilamelares e multilamelares enfocando a eficiência de encapsulamento, estabilidade das vesículas e exclusão de proteínas no caso das misturas. As proteínas Albumina de Soro Bovino (BSA), Mioglobina (Mio) e Citocromo C (Cit C) foram usadas individualmente e em misturas nas razões molares (20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20) de BSA:Mio:Cit C respectivamente. As misturas de proteínas também foram associadas à superfície das vesículas, por ligação covalente, e avaliada a sua exclusão durante o processo.

Os resultados experimentais apresentados e discutidos nos capítulos subseqüentes, descrevem o desempenho da associação de proteínas a lipossomas visando aplicações imunológicas.

1.1) Objetivos

Este trabalho tem como objetivo geral a avaliação da associação de proteínas-modelo a lipossomas visando aplicações imunoterápicas. Para atingir esse objetivo, o trabalho envolveu as seguintes etapas experimentais:

- Caracterização das proteínas quanto ao grau de hidrofilicidade.
- Determinação de metodologia adequada para a separação das proteínas não encapsuladas.
- Determinação dos perfis de encapsulamento em lipossomas das proteínas individuais e em misturas.

- Determinação dos perfis de solubilização de lipossomas em presença de tensoativo não iônico C₁₂E₅ e em plasma humano.
- Associação covalente de mistura de proteínas à superfície de lipossomas multilamelares.
- Avaliação da exclusão de proteínas nos processos de encapsulamento e de associação a lipossomas.

Capítulo II – Revisão Bibliográfica

2.0) Revisão Bibliográfica

2.1) Estrutura, Composição e Função dos Lipossomas

Lipossomas ou vesículas lipídicas (fosfolipídicas) são estruturas ocas, constituídas de um volume aquoso central circundado por uma ou várias bicamadas lipídicas concêntricas formando partículas com diâmetros da ordem de nanômetros a dezenas de micra (Papahadjoupoulos, 1978; Gregoriadis e Allison, 1980; Crommelin e Schereier, 1994; Lasic, 1993,1998).

As moléculas de fosfolipídios são constituídas por uma região polar ou cabeça hidrofílica, a qual contém o grupo fosfato, ligada através de uma ponte de glicerol à uma parte apolar ou cauda hidrofóbica formada por uma ou duas cadeias de ácidos graxos. Devido ao seu caráter anfifílico, quando os fosfolipídios são colocados em um meio apolar ou polar, as moléculas tendem a organizarem-se de forma ordenada para que a intensidade das forças de interações iônicas, estéricas, de Van der Waals e de hidratação sejam mínimas (Lasic, 1993; Crommelin e Schereier, 1994).

Em meio aquoso, os fosfolipídios organizam-se na forma de bicamadas, expondo as suas cabeças hidrofílicas e escondendo as caudas hidrofóbicas, formando estruturas planas que para atingirem estabilidade termodinâmica curvam-se e fecham-se sobre si mesmas formando vesículas esféricas designadas como lipossomas. Nesse processo de formação, os lipossomas encapsulam parte do meio aquoso em que se encontram dispersos. A bicamada formada é capaz de acomodar as moléculas hidrofóbicas encapsuladas e comporta-se como uma membrana semi-permeável com relação ao material encapsulado no núcleo aquoso das vesículas (Figura 1).

Os fosfolipídios usados na preparação dos lipossomas são obtidos de fontes naturais, semi-sintéticos, completamente sintéticos e derivatizados (Crommelin e Schereier, 1994). Os fosfolipídios de fontes naturais mais conhecidos são encontrados na gema do ovo e em grãos de soja, e apresentam-se como misturas compostas de fosfatidilcolinas (PC's),

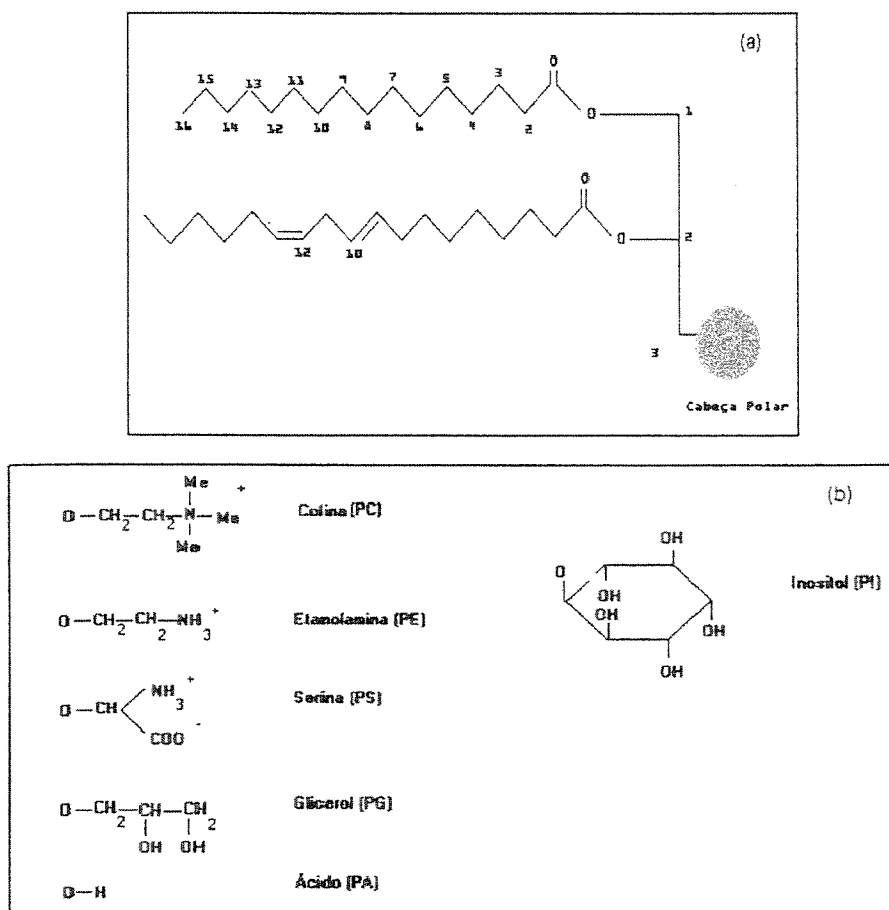


Figura 2 - Estrutura da molécula de fosfolipídio composta de cabeça polar e região apolar formada de cadeias de hidrocarbonetos saturadas e insaturadas (a). Grupos hidrofílicos que constituem a cabeça polar dos fosfolipídios usados na preparação de lipossomas (b).

Devido à flexibilidade de composição e associação com moléculas de diferentes naturezas, os lipossomas possuem um vasto campo de aplicação: nas ciências básicas, biofísica, química, indústria de alimentos, ecologia, etc. As aplicações mais desenvolvidas estão nos campos da cosmética, farmacologia e medicina.

Em aplicações imunológicas, os lipossomas funcionam como imunoadjuvantes para vacinas e como ativadores de macrófagos no sistema imunológico. A partir de 1974, as pesquisas têm mostrado que os lipossomas são excelentes adjuvantes capazes estimular

grãos de soja, e apresentam-se como misturas compostas de fosfatidilcolinas (PC's), fosfatidiletanolaminas (PE's), fosfatidilinositol (PI) e esfingomielina (SPM) com diferentes comprimentos e graus de insaturação das suas cadeias acilas (Figura 2). Esses fosfolipídios podem ser modificados através de reações de hidrogenação e que influenciam na rigidez, permeabilidade e propriedades biológicas dos seus lipossomas.

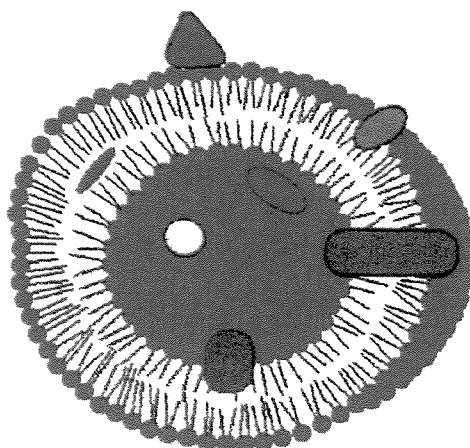


Figura 1 – Estrutura dos lipossomas com as moléculas de fosfolipídios agregadas formando a bicamada lipídica e o núcleo central aquoso das vesículas. Nessa estrutura as moléculas hidrofílicas encapsuladas localizam-se no núcleo aquoso (cor amarela) ou estão associadas às cabeças polares dos fosfolipídios na face interna ou externa da bicamada (cor púrpura). Moléculas hidrofóbicas localizam-se na bicamada lipídica (cor azul), e as moléculas com características anfifílicas situam-se entre as partes hidrofílica e hidrofóbica da estrutura (cor verde). (Adaptada de Lasic, 1993).

Fosfolipídios semi-sintéticos são derivados daqueles provenientes de fontes naturais e os completamente sintéticos são obtidos através de várias sínteses químicas, com cadeias acilas saturadas ou insaturadas e grupos polares selecionados de acordo com a aplicação. Os fosfolipídios naturais ou sintéticos podem ainda ser derivatizados com polímeros produzindo vesículas estericamente estabilizadas e adequadas para aplicações “in vivo”. (Lasic, 1988, 1993, Crommelin e Scherrieier, 1994).

potentes respostas imunes quando utilizados como suporte de muitos antígenos de interesse (Gregoriadis, 1990).

Lasic, 1993, em suas revisões, apontou as seguintes vantagens dos lipossomas nas aplicações como imunoadjuvantes: são biocompatíveis, biodegradáveis, não tóxicos, inertes e não imunogênicos; podem incorporar antígenos de natureza hidrofílica e hidrofóbica; sua preparação é fácil, reprodutiva e mais rápida comparada aos outros adjuvantes; vacinas preparadas com lipossomas estimulam quantidades mais elevadas de anticorpos funcionais, além de um aumento no tempo de circulação no sistema imune. Essas propriedades fazem dos lipossomas um dos mais importantes adjuvantes e/ou componentes de liberação de drogas. No entanto a atuação dos lipossomas no sistema imunológico ainda foi pouco estudada, de modo que os resultados ainda são muito escassos para serem generalizados.

Nas várias aplicações, a forma de preparação dos lipossomas, o tamanho, a estrutura, o tipo de fosfolipídio, o agente a ser encapsulado, influenciam na permeabilidade, estabilidade da membrana e na eficiência da aplicação a que se destinam.

2.2) Classificação dos Lipossomas

A classificação dos lipossomas ainda não é totalmente definida havendo controvérsias na literatura. Uma classificação relativamente bem aceita é a feita por Barenholz e Crommelin, 1994, baseada no tamanho, número de lamelas e morfologia das vesículas. De acordo com essa classificação as vesículas podem ser multilamelares (MLV's), oligolamelares (OLV's), multivesiculares (MVV's), unilamelares gigantes (GUV's), grandes (LUV's) e pequenas (SUV's). As vesículas multilamelares são compostas de várias bicamadas lipídicas (fosfolipídicas) dispostas na forma de lamelas concêntricas. As oligolamelares possuem menos lamelas, são maiores e bem uniformes, e as multivesiculares são compostas de vesículas grandes contidas no seu interior com tamanhos menores e variados. As vesículas unilamelares são formadas por somente uma bicamada fosfolipídica (lamela), e de acordo com o seu tamanho podem ser classificadas como gigantes, grandes ou pequenas. (Lasic, 1993; Barenholz e Crommelin, 1994;

Crommelin e Shereier, 1994). A Figura 3 apresenta as características morfológicas de cada classe de vesículas.

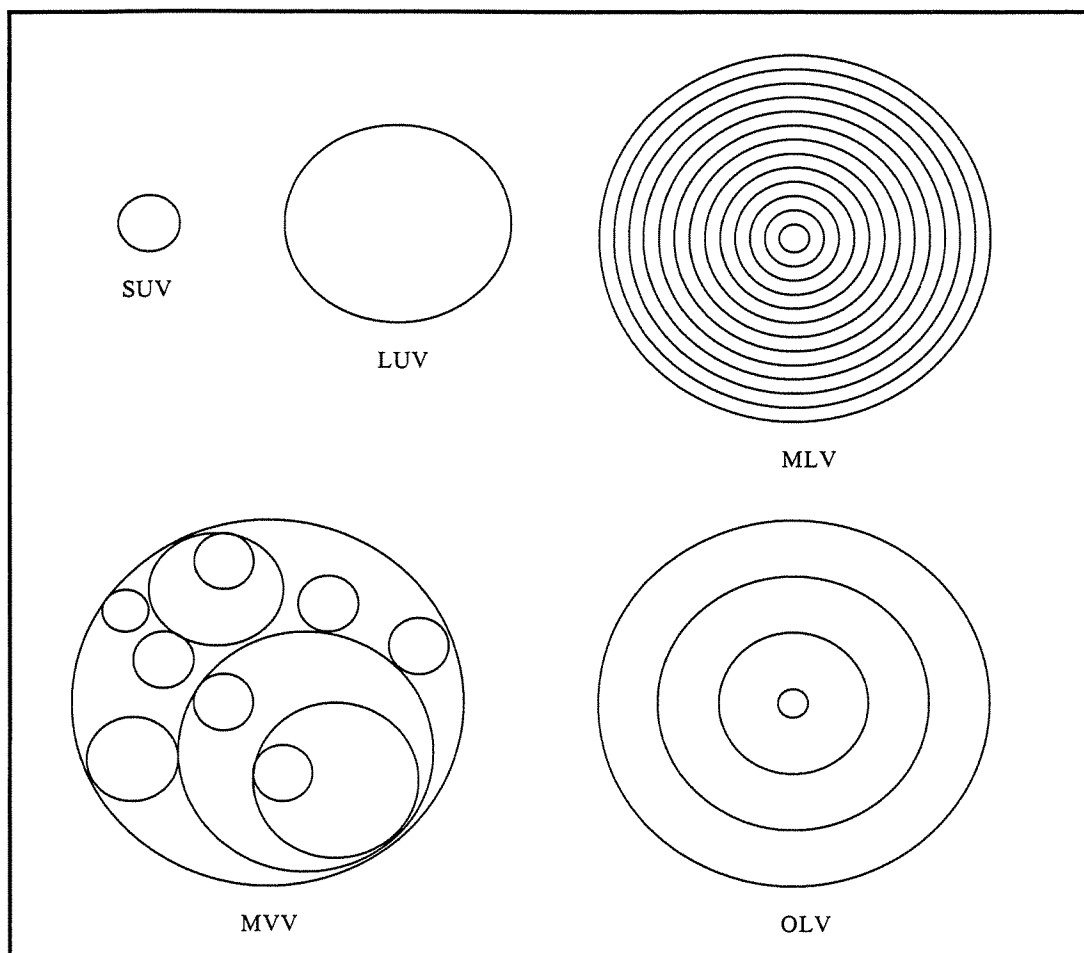


Figura 3 - Classificação dos lipossomas quanto à morfologia, tamanho e número de lamelas. SUV-Vesícula Unilamelar Pequena, LUV-Vesícula Unilamelar Grande, MLV-Vesícula Multilamelar, MVV-Vesícula Multivesicular, OLV -Vesícula Oligolamelar (Adaptada de Crommelin e Schreier, 1994).

A Tabela 1 mostra a forma características dos vários tipos de lipossomas e suas dimensões.

Tabela 1 - Faixas de diâmetros das vesículas pertencentes aos vários tipos de lipossomas. (Adaptada de Barenholz e Crommelin, 1994).

Tipo de Lipossoma	Diâmetro da Vesícula
Vesícula Multilamelar (MLV)	> 0,5 μm
Vesícula Oligolamelar (OLV)	0,1 a 1 μm
Vesícula Unilamelar Pequena (SUV)	20 a 100 nm
Vesícula Unilamelar Grande (LUV)	> 100 nm
Vesícula Unilamelar Gigante (GUV)	> 1 μm
Vesícula Multivesicular (MVV)	> 1 μm

2.3) Influência do Método de Preparação no Tipo de Lipossoma

A morfologia, tamanho e número de lamelas dos lipossomas é fortemente dependente da metodologia de preparação. De uma maneira geral os lipossomas podem ser preparados através de duas etapas básicas: hidratação e homogeneização de tamanhos das vesículas. Após o processo de encapsulamento de compostos, inclui-se a etapa de remoção destes que não foram encapsulados. Essas etapas estão presentes em quase todas as metodologias de preparação dos lipossomas descritas na literatura, porém a maneira como são realizadas influenciam drasticamente nas características finais das vesículas (Barenholz e Crommelin 1994; Crommelin e Schreier, 1994).

A Tabela 2 relaciona os métodos usados em cada etapa com o tipo de vesícula produzida.

Tabela 2 - Métodos de preparação de lipossomas e os diferentes tipos de vesículas obtidos. (SUV) - vesícula unilamelar pequena; (LUV) – vesícula unilamelar grande; (MLV) - vesícula multilamelar; (OLV) - vesícula oligolamelar. (Adaptada de Crommelin e Schreier,1994).

Método	Tipo de Vesícula Produzida
Etapa de Hidratação	MLV SUV MLV, LUV SUV
1. Métodos Mecânicos	
1a. Agitação manual ou vórtice	
1b. Microfluidização	
1c. Borbulhamento de gás inerte	
1d. Homogeneização com alto cisalhamento	
2. Métodos por Substituição de Solventes	MLV, OLV, SUV LUV, OLV, MLV MLV, OLV, LUV MLV, OLV, SUV
2a. Remoção de solventes orgânicos antes da hidratação	
2b. Evaporação da fase reversa	
2c. Uso de solventes imiscíveis em água	
2d. Uso de solventes miscíveis em água	
3. Métodos por Remoção de Detergente	SUV LUV, OLV, SUV LUV, OLV LUV, OLV, SUV
3a. Cromatografia de filtração em gel	
3b. Diálise lenta	
3c. Diálise rápida	
3d. Técnicas mistas	
4. Métodos por Modificação de Tamanho e Fusão	LUV MLV MLV SUV, LUV LUV, OLV, MLV LUV, OLV
4a. Fusão espontânea de VUP na fase gel	
4b. Congelamento / Descongelação	
4c. Liofilização	
4d. Desidratação / Reidratação seguida ou não de ajuste de diâmetro	
4e. Fusão induzida pelo íon Ca^{2+}	
4f. Crescimento de lipossomas induzido por detergente	
5. Métodos baseados em ajuste de pH	SUV, LUV
Etapa de Redução de Tamanho	OLV, SUV, LUV SUV, LUV SUV
1. Extrusão a alta pressão	
2. Extrusão a baixa pressão	
3. Tratamento ultra-sônico	
Etapa de Remoção do Material não Encapsulado	
1. Diálise	
2. Ultracentrifugação	
3. Cromatografia de Permeação em gel	
4. Resinas de Troca Iônica	

2.4) Influência das Propriedades dos Lipídios na Estrutura de seus Agregados

A estrutura dos agregados de fosfolipídios depende das propriedades das suas moléculas constituintes, tais como: dimensões relativas entre as porções hidrofílica e hidrofóbica e temperatura de transição de fases (Israelachvili e col, 1980; Lasic, 1988, 1993; Crommelin e Scherzier, 1994).

Israelachvili e col., em 1980, propôs que a morfologia das estruturas formadas por moléculas de lipídios (fosfolipídios) e outros compostos anfífilicos em soluções aquosas pode ser predita através das suas propriedades geométricas de empacotamento. Essas propriedades são relacionadas com as dimensões relativas das porções hidrofílicas e hidrofóbicas das moléculas e podem ser representadas pelo parâmetro de empacotamento P , definido de acordo com a equação 1.

$$P = \frac{V}{A_0 * l_c} \quad (1)$$

Onde V é o volume da região hidrofóbica, A_0 é a área superficial ótima (definida como área ocupada pela porção hidrofílica quando a energia de integração entre lipídios é mínima) e l_c é o comprimento crítico da cadeia hidrofóbica (comprimento efetivo que as cadeias podem assumir quando totalmente distendidas).

Para P menor que 1/3, a estrutura formada é a de micela esférica, e as moléculas podem ser geometricamente representadas por um cone. Para P aproximadamente igual a 1, as moléculas com uma ou duas cadeias apolares, são representadas por lamelas cilíndricas e em forma de cone e tronco de cone com estrutura lamelar planas, com P entre 1/2 e 1 podem formar lipossomas, enquanto para P maior que 1 formam micelas invertidas. Outros fatores que podem afetar as estruturas formadas pelas moléculas são: o tamanho da parte hidrofílica, presença de ramificações e insaturações da parte hidrofóbica, força iônica do meio aquoso e temperatura. A agregação dos fosfolipídios na fase lamelar constitui a forma de organização preferencial dos lipossomas para aplicações envolvendo o

encapsulamento e liberação controlada de drogas. A Figura 4 mostra a relação entre a forma geométrica das moléculas de lipídios (fosfolipídios), seus respectivos parâmetros de empacotamento a forma de organização e as fases dos agregados.

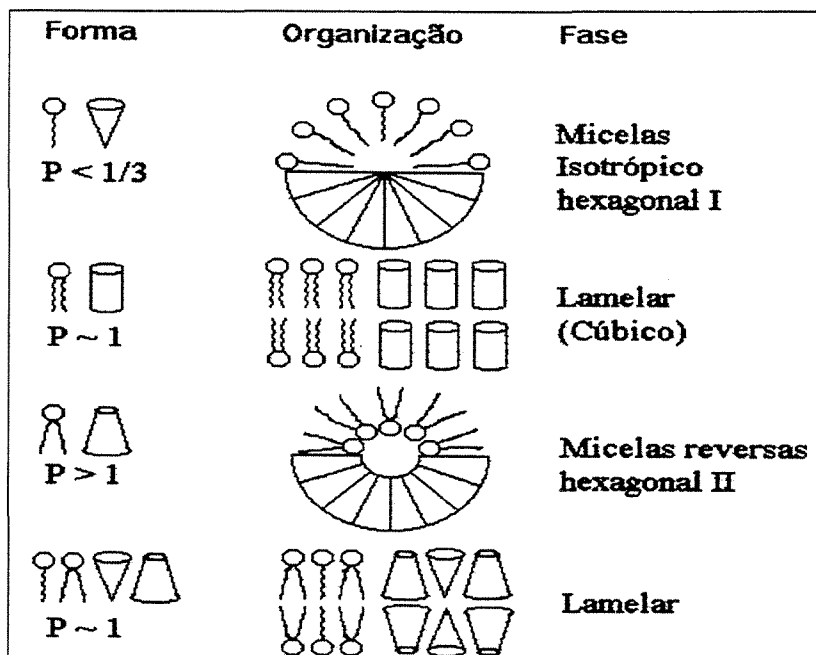


Figura 4 - Forma de agregação das moléculas de lipídios (fosfolipídios) de acordo com o parâmetro geométrico P . Este parâmetro depende do tipo de lipídio, das misturas dos mesmos, dos grupos funcionais pertencentes às cabeças polares e também das cadeias de acilas.

Além das dimensões relativas entre as partes polares e apolares das moléculas, a agregação dos fosfolipídios é influenciada pela presença de ramificações e insaturações na parte hidrofóbica das suas moléculas, pela força iônica do meio aquoso e temperatura de transição de fases. Quando os agregados estão na forma lamelar, a temperatura de transição de fases dos fosfolipídios determina o estado das suas cadeias de hidrocarbonetos na bicamada fosfolipídica. Esses estados também chamados de fases são designados como cristal líquido-fluido e gel-sólido. O primeiro caso ocorre quando as bicamadas são formadas acima da temperatura de transição de fases dos fosfolipídios, e é caracterizado por uma maior movimentação das cadeias acila no agregado (as cadeias ficam mais soltas,

maleáveis), resultando em bicamadas mais fluidas e com maior permeabilidade. No estado gel-sólido, abaixo da temperatura de transição de fases, as cadeias acila têm o seu movimento restrito (ficam mais compactas) e as bicamadas resultantes são mais rígidas e possuem menor permeabilidade. A transição de fases dos fosfolipídios se dá de forma bem definida e à temperatura constante. A adição de colesterol aos fosfolipídios faz com que a transição de fases ocorra de forma mais suave, podendo até ser eliminada em concentrações mais elevadas desse esteróide. A Figura 5 apresenta esquematicamente o estado das cadeias acila nas bicamadas fosfolipídicas preparadas acima e abaixo da temperatura de transição de fases dos seus fosfolipídios.

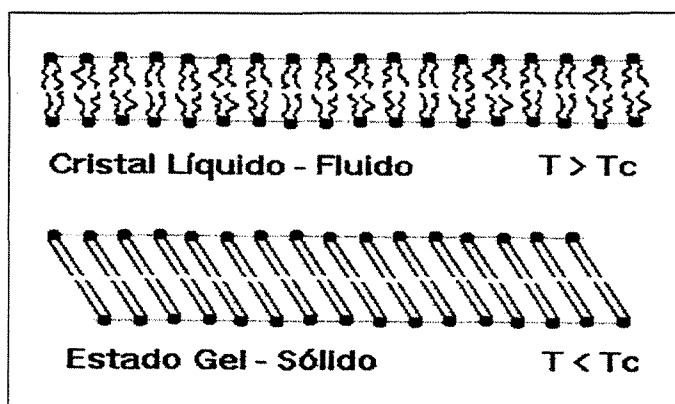


Figura 5 - Influência da temperatura de preparação das bicamadas lipídicas no estado de agregação das cadeias acila. Acima da temperatura de transição de fases, T_c , as cadeias acila são mais livres para movimentarem-se caracterizando o estado cristal líquido-fluido. Abaixo da temperatura de transição de fases as cadeias acila possuem movimentos limitados que caracterizam o estado gel-sólido.

Na formação dos lipossomas a partir de agregados fosfolipídicos, quatro tipos de forças de interação estão envolvidas: forças eletrostáticas, de Van der Waals, forças relacionadas à hidratação e estéricas. As forças eletrostáticas estão presentes principalmente em lipossomas formados por fosfolipídios com cabeças polares carregadas, podendo agir desestabilizando a bicamada fosfolipídica através da repulsão entre as cabeças polares, ou evitando a aproximação de outros lipossomas com conseqüente fusão e agregação. O pH, a constante dielétrica e a força iônica do meio são de extrema importância na intensidade das forças eletrostáticas.

As forças de Van der Waals atuam na parte hidrofóbica ou apolar dos fosfolipídios e concorrem para a estabilização da bicamada fosfolipídica e formação das vesículas. Forças de hidratação estão presentes na solubilização dos agregados lipídicos. As forças estéricas são de repulsão e ocorrem com maior intensidade em lipossomas formados por fosfolipídios com cabeças polares grandes, geralmente formadas por glicolipídios ou derivatizadas com polímeros como o polietilenoglicol.

2.5) Preparação dos Lipossomas pelo Método de Hidratação do Filme Seco de Lipídios

O método da hidratação do filme seco de lipídios consiste na deposição de finos filmes de lipídios (fosfolipídios), formados a partir da evaporação de solvente orgânico nas paredes de um recipiente de fundo redondo, seguida de agitação com excesso de solução aquosa à temperatura acima da transição de fases dos lipídios.

Os lipossomas formados por esse processo são do tipo multilamelar (MLV's), com uma larga faixa de distribuição de tamanhos. Embora a hidratação do filme seco de lipídios seja amplamente usada na preparação de lipossomas, o mecanismo da formação das MLV's ainda não é bem explicado. Na hidratação, as bicamadas deslizam umas em relação às outras, para a máxima exposição das cabeças polares dos lipídios à água. Durante essa transformação, as bicamadas se estabilizam à uma distância resultante do equilíbrio entre as forças repulsivas de hidratação, estéricas, eletrostáticas e atrativas de Van der Waals. Sob agitação, as bicamadas se desprendem, selando as suas extremidades, dando origem aos MLV's conforme mostra a Figura 6. Esta metodologia é bastante utilizada na preparação dos lipossomas (New, 1990; Lasic, 1993; Crommelin e Scherrieier, 1994).

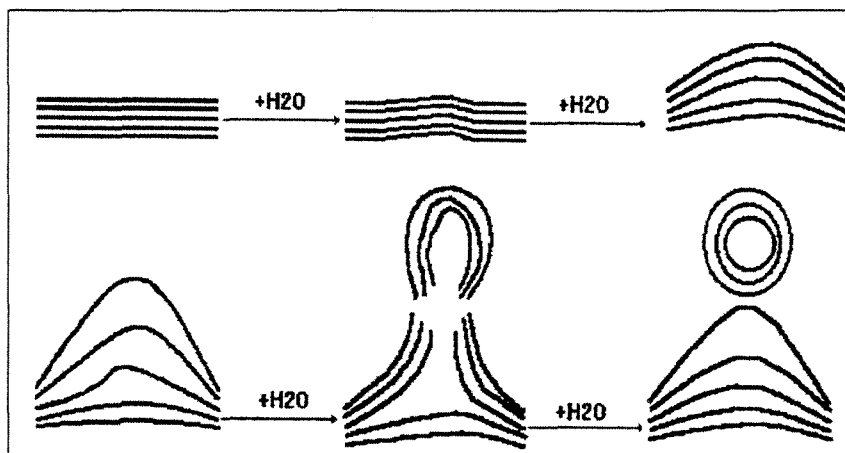


Figura 6 - Formação dos lipossomas multilamelares pela hidratação do filme seco de lipídios. As linhas indicam as bicamadas de fosfolipídios (Adaptado de Lasic, 1993).

2.6) Métodos de Caracterização dos Lipossomas

Os lipossomas possuem grandes variações em suas propriedades físicas e químicas, principalmente relacionadas ao tamanho, distribuição de tamanhos, lamelaridade, permeabilidade, estabilidade, eficiência de encapsulamento e grau de degradação (Lasic, 1993; Crommelin e Scherrier, 1994).

Os métodos de caracterização dos lipossomas podem ser agrupados nas seguintes categorias: microscopia, espectroscopia, difração e espalhamento de luz, termodinâmica, hidrodinâmica, mecânica e química. Outros métodos de natureza biológica, como testes “in vitro” e “in vivo” são realizados com objetivo de determinar a reatividade, a estabilidade e efeitos da liberação do material encapsulado.

Em geral os lipossomas podem ser caracterizados quanto ao tamanho, homogeneidade e lamelaridade através da microscopia eletrônica. Dentre as várias técnicas, a microscopia eletrônica de transmissão é a que conduz a melhores resultados por manter as características morfológicas das vesículas.

As técnicas espectroscópicas estimam o tamanho, estrutura e concentração dos lipossomas através da turbidez das soluções. Nessa categoria, além da espectroscopia ultra violeta – visível, inclui-se a Raman e infravermelho, ressonância magnética nuclear (NMR) e ressonância paramagnética de elétrons (EPR), e o espalhamento quase elástico de luz (QLS), amplamente utilizado para a determinação do raio hidrodinâmico e distribuição dos tamanhos das vesículas através do seu coeficiente de difusão.

Os métodos termodinâmicos tais como a calorimetria, dilatometria e eletroquímicos são utilizados no estudo de transição de fases e estabilidade dos lipossomas através de seus calores de dissolução ou propriedades da superfície utilizando valores medidos do calor de adsorção.

2.7) Tipos e Indução de Resposta Imunológica

A resposta imune é composta por uma complexa sequência de eventos, sendo desencadeada pela indução de um estímulo (imunógeno ou antígeno) e, geralmente, culmina na eliminação do agente provocador. O agente indutor poderá ser um microorganismo patogênico, um aloenxerto, uma proteína, ou uma substância inócua do meio ambiente. Três tipos de células são determinantes no processo de resposta imune: macrófagos, linfócitos T (células T) e linfócitos B (células B). As respostas imune podem ser classificadas como em resposta imune inata e a adaptativa, que se diferenciam pela especificidade e a memória imunológica que são propriedades da imunidade adquirida.

A resposta imune inata, também chamada de imunidade natural, presente desde o nascimento, inclui numerosos elementos não específicos como barreiras físicas (pele, mucosa) que forma a primeira barreira de defesa contra agentes estranhos. No caso específico de uma bactéria ter invadido o organismo, há o encontro de outros elementos do sistema imune inato a enzima chamada de lisozima largamente distribuída nas secreções, atuando nas paredes celulares das bactérias promovendo sua lise. Diferentemente das bactérias, contra vírus a resposta imune inata é implementada por células NK (matadoras naturais) e por interferons. Outro fator que também é ativado por uma variedade de

bactérias é na alternativa do complemento e com esses, eliminam também as bactérias por lise ou facilitação de fagocitose. Estas células são linfócitos capazes de se ligar aos vírus ou às células tumorais através de mecanismos ainda pouco entendidos. Elas se distinguem dos linfócitos T citotóxicos pelos antígenos existentes na sua membrana e por não exibirem memória imunológica. A ação dos interferons produzidos pelos linfócitos e células infectadas por vírus, elevam a resistência de células normais contra infecções virais e por isso constituem mecanismos importantes na defesa anti-vírus.

A resposta imune adaptativa ocorre quando o sistema imune inato não elimina os antígenos invasores. Na ontogenia de resposta imune, este tipo, é o mais recente na evolução biológica distinguindo-se pela especificidade e por sua memória, sendo restrita, mais rápida e mais intensa. Neste tipo de resposta o organismo promove séries de eventos que conduzem à ativação de linfócitos e a produção de anticorpos, os quais são altamente específicos para os imunógenos.

As principais células deste tipo de resposta são as células apresentadoras de antígeno (APC's), os linfócitos derivados do timo (células T) e linfócitos derivados da medula óssea (células B).

O processamento do antígeno e sua apresentação ao sistema imunológico ocorre por meio de uma seqüência complexa de eventos os quais ativam ou induzem a produção de várias substâncias moduladoras que contribuem com a regulação (amplificação ou supressão) da resposta imune.

Os linfócitos T considerados as principais células organizadoras e reguladoras da resposta imune, reconhecem os imunógenos apenas juntos com o complexo de histocompatibilidade (CPH) sobre a superfície das outras células. Com isso, o primeiro passo da resposta imune após a entrada do imunógeno é a apresentação pelos APC's em associação com as moléculas de classe II do CPH a uma subpopulação das células T denominadas células T auxiliares (Th).

Embora todas as células somáticas expressem as proteínas de classe I do CPH, relativamente poucos tipos de células expressam proteína da classe II. Macrófagos, células dendríticas nos tecidos linfóides, células de Langerhans na pele, células de Kupffer no fígado, e células microgliais no tecido do sistema nervoso central, são muito similares entre si e podem ter um precursor comum. As células B são produtoras e precursoras das células secretoras de anticorpos, também expressas como moléculas de classe II. As células apresentadoras de antígenos (APC's) realizam a fagocitose ou pinocitose dos imunógenos, os quais são modificados nos vacúolos endocíticos, no citoplasma. Os passos do processamento dos antígenos podem variar desde desnaturações até as proteólises. No caso das proteólises, fragmentos dos imunógenos (epítopes – grupos específicos) se ligam de forma covalentemente com as CMH II e o complexo é transportado para a superfície da célula, onde fica acessível às células T. Somente um número limitado de fragmentos peptídicos de antígenos protéicos são capazes de associação com as moléculas de classe II para formar o complexo imunogênico. Peptídeos semelhantes são chamados de epítopes imunogênicos. Acredita-se que todos epítopes imunogênicos ficam ao redor de um sítio individual de ligação na molécula de classe II. Embora não usual, as células B, podem, também apresentar antígenos às células T. As células B não somente expressam proteínas de classe II, mas também possuem um eficiente mecanismo de captura para antígenos específicos através de receptores de antígenos formados por imunoglobulinas específicas. As células B sozinhas são fracas ativadoras de células T virgens ou em repouso porque essas células T requerem fatores de ativação auxiliares, que as células B não fornecem. Mínimas quantidades de imunógenos processadas pelas células B são necessários para ativação das células T de memória. Os macrófagos provavelmente tenham uma possível predominância como APC na resposta imune inicial, ou primária enquanto que as células B devem predominar na resposta de memória, ou secundária. (Allison e Gregoriadis, 1974; Dal Monte e Szoka, 1989; Gregoriadis, 1990; Stites e Terr, 1991; Buiting e col., 1992).

De acordo com as revisões de Dal Monte e Szoka, 1989; Su e Van Rooijen, 1989; e Van Rooijen, 1989; Szoka, 1992, os mecanismos de interação dos antígenos livres ou acoplados a carreadores com o sistema imune ainda não é bem entendido, mas acredita-se que eles podem interagir com as células apresentadoras de antígenos (APC's), como os

macrófagos, células B e células dendríticas. Vários experimentos “in vitro” e “in vivo” confirmam que os macrófagos são as células mais importantes no processamento dos antígenos. Na Figura 7 verifica-se o esquema de indução das respostas imunes.

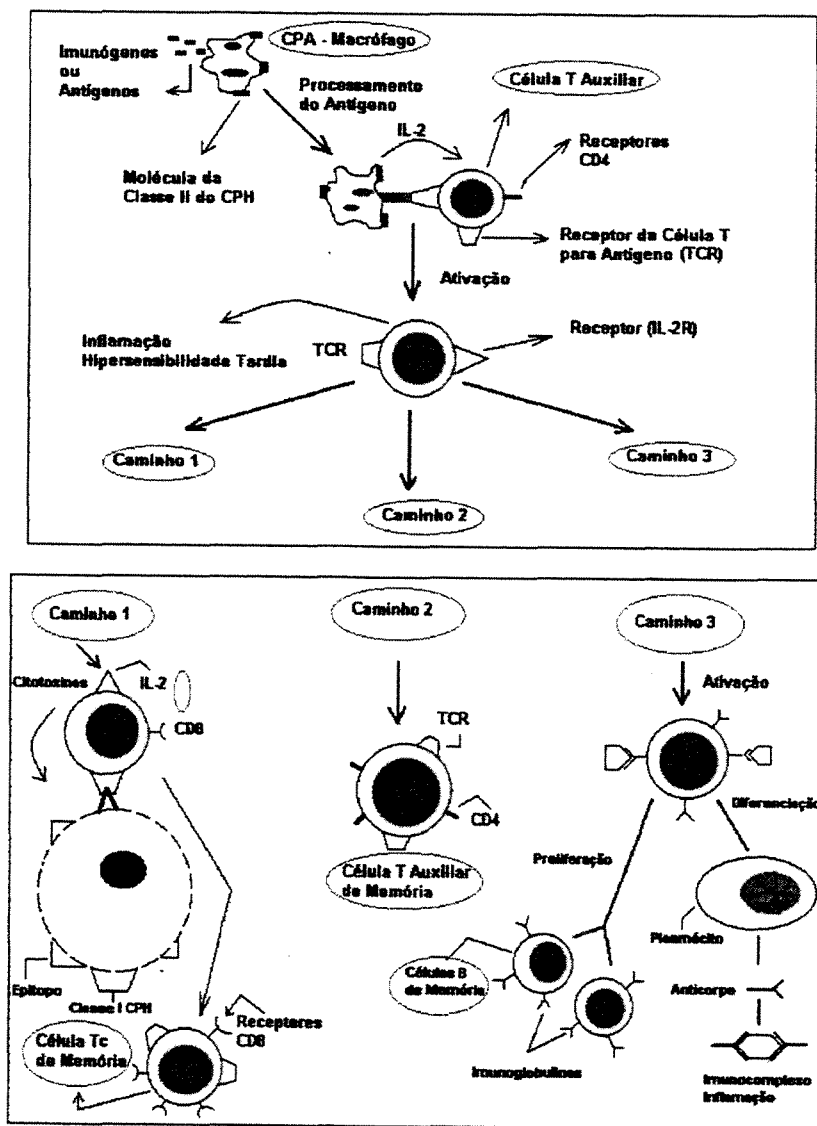


Figura 7 - Esquema de indução das respostas imunológicas. Os imunógenos e os antígenos neste caso, podem ser os lipossomas encapsulando alguma proteína ou droga (Adaptada de Stites e Terr, 1991).

2.8) Lipossomas como Imunoadjuvantes.

Em 1974, Allison e Gregoriadis mostraram que a imunogenicidade de proteínas era aumentada quando associada a lipossomas. Eles verificaram que comparando os lipossomas com adjuvantes de Freud e emulsões de água em óleo as respostas imunes obtidas tinham maior intensidade além de menor toxicidade. Outra observação desses pesquisadores é que doses iguais de formulações com antígenos encapsulados promoviam maior formação de anticorpos comparadas àquelas com antígenos administrados na forma livre. O estudo da influência das cargas superficiais dos lipossomas na indução da resposta imune, foi realizado com o antígeno tétano toxóide que foi encapsulado em lipossomas com carga negativa induzindo maior produção de anticorpos quando comparado ao antígeno administrado livremente. Quando os mesmos antígenos foram incorporados em lipossomas com carga positiva a produção de anticorpos foi muito pequena em relação aos antígenos livres.

Em relação aos processos alérgicos provenientes de fungos, Mehta e col., 1984 pesquisaram sobre o assunto através de estudos “in vitro” fazendo comparações com a droga anfotericina B não encapsulada (administrada livremente) e encapsulada em lipossomas MLV's formados por DSPC e DMPG, na razão molar 7:3. A droga encapsulada não produziu toxicidade, como observada com a droga livre. A estimulação de anticorpos em experimentos “in vivo” tanto para droga encapsulada ou livremente administrada foram inibidas. Os resultados sugestionaram que a droga encapsulada em lipossomas reduz os efeitos imunossupressivos que ocorrem quando a droga é administrada livremente.

Outros estudos verificaram que conjugados de lipossomas grandes exigiam a participação dos macrófagos na indução das respostas imunes, podendo induzir respostas variadas, o que não ocorria com lipossomas pequenos, os quais em muitos casos eram processados diretamente pelas células B (Francis e col., 1985).

A incorporação espontânea de proteínas e peptídeos em bicamadas pré-formadas foi estudado por Mahendra e Zakin, 1986. Foram observados em seus estudos que o estado de

organização da bicamada é um dos principais fatores que influenciam a estabilidade dos lipossomas, além disso observaram que a inserção e liberação dos agentes encapsulados, bem como a presença de substâncias tais como: ácidos graxos, lisofosfolipídios, mistura de diferentes fosfolipídios, colesterol e detergentes aumentavam os defeitos nas bicamadas e contribuíam para incorporações espontâneas. Essas imperfeições são provavelmente sítios de reação ou interação promovendo fusões, trocas intervesículas e movimentos entre bicamadas dos fosfolipídios. Nesse mesmo estudo verificou-se que defeitos locais na organização das bicamadas aumentavam a energia conduzindo a um aumento das taxas de incorporação espontânea e à fusão entre as bicamadas. O objetivo desta revisão foi a elaboração de uma base de restrições relacionados às incorporações espontâneas de proteínas na bicamada lipídica e propor condições apropriadas possibilitando a modulação destas restrições para atingir reconstituições espontâneas das proteínas dentro de bicamadas pré-formadas.

Davis e Gregoriadis, 1987, em seus trabalhos, estudaram o efeito de várias formulações de lipossomas compostas por misturas equimolares de fosfolipídios (DLPC, DOPC, PC, DMPC, DPPC e DSPC) e colesterol nas respostas imunes quando a proteína toxóide do tétano era incorporada nas vesículas (encapsulada ou ligada covalentemente na superfície das mesmas). Nesses estudos foi considerado a razão Fosfolipídio:Proteína, as temperaturas de transição de fase e o método de incorporação da proteína nos lipossomas relacionados com a respostas imunes. A administração foi feita em cobaias (camundongos) pela via intramuscular com várias quantidades de antígenos, livres, encapsulados em vesículas MLV's produzidas por desidratação e rehidratação (DRV) ou ligada covalentemente com os mesmos tipos de lipossomas preparados pelo método tradicional (hidratação do filme seco de lipídios). Em duas administrações idênticas separadas em um intervalo de 4 semanas, anticorpos IgG1 e IgG2b específicos para o antígeno toxóide foram estimulados e observados em soro coletado das cobaias. Os resultados sugeriram que (i) o efeito adjuvante dos lipossomas é consideravelmente melhor quando as razões mássicas de Fosfolipídio:Proteína ficavam em torno de 2049:1, entretanto diminui quando a razão mássica atingia altos valores (90361:1), (ii) a estimulação de anticorpos foram similares para lipossomas com razões mássicas (14,3 – 33,0:1) com vários tipos de fosfolipídios com

temperaturas de transição de fases que variavam de -32°C até 47,5°C, mas são baixos ou inexistentes quando utilizado o fosfolipídio DSPC (Tc 54°C). Esses resultados foram similares tanto para o antígeno encapsulado como ligado covalentemente à superfície das vesículas.

Uma pesquisa desenvolvida que levava em consideração dois tipos de associação de antígenos aos lipossomas na indução e estimulação de respostas imunes, promovendo isotipos IgM e IgG primárias e secundárias em camundongos utilizando como antígeno a proteína albumina de soro bovino na forma livre, encapsulada em lipossomas ou ainda ligada covalentemente na superfície externa dos mesmos. Os resultados obtidos mostraram que todos os tipos de associações induziram ou estimulavam potencialmente respostas imunes humorais. A proteína encapsulada estimulou o isotipo IgG principalmente, com pouca ou nenhuma estimulação do isotipo IgM, enquanto que a proteína ligada covalentemente na superfície das vesículas estimulavam a produção dos isotipos IgG e IgM em proporções semelhantes. Os resultados sugeriram que o modo de associação dos antígenos aos lipossomas influenciava na estimulação dos isotipos (Shahum e Thérien, 1988).

Trabalhos desenvolvidos por Xiao e col., 1988, verificaram a ação imunoadjuvante de lipossomas encapsulando o peptídeo do vírus da pólio. O peptídeo foi o 3VP2 (W1) (CFNKDNAVTSPKREFC) encapsulados em lipossomas DRV (produzidos por desidratação e rehidratação) compostos por DMPC ou DSPC juntamente com colesterol em misturas equimolares (32 µmol). Com relação a razão mássica Fosfolipídio:Peptídeo o valor utilizado foi de 80:1. As formulações de lipossomas com os dois tipos de fosfolipídios foram testadas, assim como o peptídeo livre em camundongos através de administração intramuscular. Os resultados mostraram que ambos os tipos de lipossomas com o peptídeo associado induziam respostas imunes (anticorpos), sendo que os peptídios administrados livremente foram inativos. Os lipossomas formados por DSPC (DRV) forneceram respostas secundárias de todas as classes IgG e com mais intensidade do que aqueles formados por DMPC (DRV) que não estimularam respostas da subclasse IgG2a. Outros testes foram

feitos utilizando os fosfolípidos DSPC e DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) alternadamente em misturas equimolares com colesterol na razão molar 80:1 de Fosfolípido:Peptídeo, e não se observou ação imunoadjuvante com o peptídeo encapsulado, ao contrário do que Davis e Gregoriadis, 1987, afirmaram.

A proteína clonada R32tet₃₂, contendo seqüências de um tetrapeptídeo de uma região repetida da proteína circumporozoide do esporozóite *Plasmodium falciparum* foi encapsulada na pesquisa realizada e analisada por Richards e col., 1988, examinando a imunogenicidade em coelhos e macacos. Outros adjuvantes foram testados como: lipídio A e hidróxido de alumínio. Quando a proteína clonada livre era administrada sozinha (sem adjuvantes) em coelhos, foram somente observadas respostas secundárias entre 32 e 36 semanas após a administração (vias intramuscular e intravenosa). Quando foi utilizado hidróxido de alumínio com o antígeno adsorvido, uma mínima resposta primária foi observada e depois de 2 semanas uma quantidade moderada de resposta secundária em termos de anticorpos foi observada, mas o nível de anticorpos diminuía em oito semanas após pré-imunizações. Quando essa proteína clonada foi encapsulada na presença ou não de lipídio A e hidróxido de alumínio observou-se forte indução de respostas tanto primária ou secundária em termos de anticorpos. Os autores concluíram que havia um efeito aditivo quando se usava lipossomas com lipídio A e hidróxido de alumínio.

As respostas imunes humorais em camundongos foram observadas através de baixas doses de albumina de ovos de galinhas (1-100 µg) livre, encapsulada ou ligada covalentemente à superfície dos lipossomas e analisadas através de três rotas de administração (intravenosa, intraperitoneal e subcutânea). O efeito imunoadjuvante observado era dependente da localização do antígeno (ligado na superfície ou englobado em seu interior) e do número de imunizações. Em uma imunização individual, lipossomas com a proteína ligada à superfície estimularam altos níveis de anticorpos independente da rota de administração. Para múltiplas imunizações (intravenosa ou intraperitoneal) os níveis de anticorpos também foram superiores comparados com a proteína administrada livremente ou encapsulada, mas quando analisado depois de múltiplas imunizações

subcutâneas o nível de estimulação de anticorpos não aumentou em relação à proteína livre. Os lipossomas preparados foram multilamelares preparados com DSPC:Col na razão molar 2:1 (15 μmol :7,5 μmol). Para ligar a proteína à superfície das vesículas utilizou-se o estereato de p-nitrofenil e o p-fenilenodiamina (1,1 μmol) (Vannier e Snyder, 1988).

Trabalhos com adjuvantes alternativos para novas vacinas e tratamentos imunoterápicos, incluindo a aplicação dos lipossomas incorporando peptídeos como forma alternativa para aumento da imunogenicidade, foram desenvolvidos por Warren e Chedid, 1988. Os lipossomas não provocaram efeitos colaterais em comparação com os adjuvantes tradicionais como sais de alumina. Proteínas e peptídios recombinantes, de baixa imunogenicidade, produziram excelente resposta imune quando associados aos lipossomas, constituindo uma nova classe de imunoterápicos.

William, e Stewart, 1989 estudaram a capacidade de encapsulamento de extratos alérgicos de ácaros por lipossomas multilamelares, unilamelares e vesículas de fase reversa (REV). Os fosfolipídios utilizados foram dipalmitoilfosfatidilcolina (DPPC) e fosfatidilglicerol (PG), e o colesterol (Col). Os lipossomas MLV's foram produzidos pelo método da hidratação do filme seco de lipídios com razões molares de 7:1:2 (DPPC:PG:Col). Vesículas unilamelares foram produzidas pelo método de injeção de etanol em solução do extrato de ácaros dissolvida em tampão fosfato (PBS) com as mesmas razões do caso anterior. Os lipossomas MLV's-DRV foram preparados pelo método da desidratação e rehidratação com as mesmas proporções dos casos anteriores onde o extrato de ácaros em tampão foram adicionados em frasco com borbulhamento de gás nitrogênio, seguido de sonicação (4 °C por 5 minutos) e remoção dos solventes orgânicos por evaporação a vácuo por 30 minutos. As eficiências de encapsulamento foram 36% (SUV's), 29% (MLV's) e 14% (REV's). Vesículas multilamelares incorporaram proteínas do extrato, na faixa de pesos moleculares que variavam de 14 kDa a 67 kDa, e verificou-se que proteínas com pesos moleculares 16, 36 e 43 kDa eram excluídas quando foram encapsuladas em SUV's e MLV's-REV como observado pela eletroforese SDS-PAGE. Essa exclusão, segundo os autores, poderia ser relativa ao prolongado tempo de exposição

do extrato de ácaro com solventes orgânicos na preparação de REV's e SUV's. Observaram respostas imunes de todas as classes IgG, mas não das IgE ao se fazer teste imune em camundongos.

Gregoriadis, (1990,1993) apresentou trabalhos de revisão sobre a adjuvantividade de lipossomas para proteínas e peptídios incorporados. Foi observado que a superfície das proteínas de muitos organismos patogênicos possuem regiões que são utilizadas pelas células do sistema imune fornecendo respostas protetivas. Essas regiões são chamadas de epítopes, e podem induzir determinadas respostas específicas. As proteínas por terem várias seqüências peptídicas apresentam vários epítopes, podendo estimular várias respostas imunes ou então uma só resposta em maior intensidade. Epítopes semelhantes aos de bactérias, fungos e protozoários podem ser reproduzidos com proteínas e peptídeos recombinantes ou sintéticos em aplicações imunoterápicas.

Therién, e col., 1991, estudaram a adjuvantividade de lipossomas considerando a influência da razão Proteína:Lipídio e da dose administrada nas respostas humorais utilizando como antígeno a proteína albumina de soro bovino tanto encapsulada como ligada covalentemente na superfície das vesículas. Os lipossomas foram preparados com os seguintes fosfolipídios: dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), dipalmitoilfosfatidil etanolamina (DPPE) e o esteróide colesterol, nas proporções: 63:6:31 preparados pelo método de hidratação do filme seco de lipídios e após preparação foi realizada a passagem da solução de lipossomas em membranas de policarbonato com tamanho de poro de 0,2 µm (SUV's). As imunizações foram realizadas em camundongos pela via intraperitoneal e os autores observaram a produção de imunoglobulinas totais IgG e IgM e os isotipos G (IgG1, IgG2a e IgG3) os quais foram caracterizados. O caráter adjuvante dos lipossomas foi confirmado pelo modo de associação do antígeno. Os dois tipos de formulações de lipossomas forneceram variações nos tipos de respostas. Os resultados sugeriram que antígenos ligados à superfície estimularam o sistema imune em baixas doses quando comparados aos antígenos encapsulados no interior das vesículas, em contra partida a

sensitividade em relação às razões Proteína:Lipídio estimularam a produção de imunoglobulinas de isotipos particulares em condições controladas.

Extratos alergênicos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Lolium perenne*, *Phleium pratense*, *Parietaria judaica*, *Artemisia vulgaris* e pêlos de gatos foram encapsulados em lipossomas neutros, carregados positiva e negativamente. Foi utilizado o DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina) e colesterol nas formulações e as respostas imunes foram testadas em camundongos (via subcutânea) e comparadas com os extratos livre ou outros adjuvantes como o hidróxido de alumínio. Os níveis de IgG se elevaram quando utilizados os três tipos de lipossomas em comparação com o extrato livre obtendo, neste caso, boa eficiência de encapsulamento e grande especificidade. Os níveis de IgE específicos aos extratos alergênicos foram maiores quando lipossomas carregados negativamente ou adsorvidos em hidróxido de alumínio foram utilizados em relação aos lipossomas neutros e carregados positivamente. Os resultados deste trabalho, em termos de respostas imunes, confirmaram o efeito imunoadjuvante, além da ausência de toxicidade, mas os autores sugeriram que outros estudos farmacocinéticos e clínicos em humanos devem ser feitos para confirmar a eficácia contra doenças alérgicas e o adequamento em imunoterapias (Audera e col., 1991).

A influência de lipossomas sensíveis a baixos pH's na indução das respostas mediadas por células foi pesquisada por Reddy e col., 1991. Os resultados mostraram que os antígenos devem ser sintetizados endogenamente. Nesse trabalho foi feita a incorporação de proteína solúvel (em tampão Hepes 50 mM) como a OVA (ovoalbumina) em lipossomas preparados pelo método da hidratação do filme seco de lipídios, sendo formadas vesículas unilamelares (SUV's). Os lipossomas sensíveis a pH's eram formados por dioleoilfosfatidiletanolamina (DOPE) e 1,2-dioleoil-sn-3-succinil glicerol (DOSG) (razão molar 1:1) e os lipossomas insensíveis a pH's eram compostos por dioleoilfosfatidilcolina (DOPC), fosfatidilserina (PS) e colesterol (razão molar de 5:2:3), as razões molares dos complexos Antígeno-Fosfolipídio foram de 40-150 µg de Antígeno:mg de Fosfolipídio. Os

testes imunes foram realizados em cobaias (camundongos) através da via intravenosa, observando-se a indução de resposta celular e memória imunológica.

Formulações de lipossomas foram estudadas com objetivo de verificar melhorias no prolongamento dos tempos de residência e potencial para a liberação controlada de drogas. Os lipossomas foram preparados pelo método da hidratação do filme seco de lipídios, utilizando os fosfolipídios PC (fosfatidilcolina) e NGPE (N-(polietileno glicol)-fosfatidiletanolamina), além do colesterol e GM₁ (monosialogangliosídeo) sendo analisado os lipossomas preparados nas razões molares 10:5:1 de (PC:Col:GM₁) e 2:1 de (PC:Col) e com diâmetros médios entre 100 e 1000 nm, os quais foram injetados intravenosamente em camundongos e medidos após 4 horas depois da administração, os resultados mostraram que vesículas grandes são facilmente eliminados do sistema imune (fígado), e aqueles que possuem em sua formulação o GM₁ são retidos no baço em grande parte, mas para lipossomas com diâmetros menores que 300 nm houve um maior prolongamento do tempo de residência. Com a proteína AF (asialofetúina) incorporada às vesículas com razões mássicas variando de 1:27 até 1:160 de (Proteína:Fosfolipídio) foi observado um aumento do tempo de residência nas formulações com ou sem GM₁ e com as mesmas razões molares do caso anterior (10:5:1 de PC:Col:GM₁ ou 2:1 de PC:Col) em torno de 15 minutos após a injeção, ao contrário do que ocorria com a proteína administrada livremente (detectável por 1 minuto). Outra observação feita, foi relativo as baixas razões AF:Fosfolipídio com a presença de GM₁ que possuíam um tempo de residência maior comparados com as altas razões utilizadas. Com relação a ricina A que foi conjugada ao NGPE e depois incorporada nos lipossomas de mesmas composições com ou sem GM₁ verificou-se que o tempo de residência foi aumentado em relação a ricina livre, acima de 1 hora depois da administração. De uma forma geral houve aumento desse tempo na ordem de 2-150 vezes para todas as formulações, além da dependência da razão Proteína:Lipídio, tamanho dos lipossomas e a composição. A inserção de um peptídeo derivado do fator A da levedura *Saccharomyces cerevisiae* também foi utilizada e observou-se o aumento do tempo de circulação dos lipossomas com liberação do peptídeo lentamente. A adição de GM₁ incorporado na membrana dos lipossomas reduz significativamente a tomada dos lipossomas pelo sistema retículo endotelial prolongando o tempo de residência no sangue,

mas esse efeito foi limitado quando utilizados lipossomas pequenos (Maruyama e col., 1991).

Alving, 1991, fez uma revisão de trabalhos em que lipossomas eram utilizados como carreadores de antígenos protéicos e peptídicos. Esses materiais antigênicos podem ser ligados superficialmente aos lipossomas, encapsulados dentro do espaço aquoso interno ou reconstituídos dentro da bicamada lipídica. Devido à tendência natural dos lipossomas de interagirem com os macrófagos, eles têm sido usados como carreadores de antígenos, além de uma variedade de adjuvantes e mediadores como: lipídio A muramyl dipeptídeo e seus derivados, interleucina 1 e 2. Testes realizados em culturas de células estimularam a imunidade celular produzindo os CTL's e linfócitos auxiliares. Essas conclusões indicam que os lipossomas são potentes para serem aplicados em vários procedimentos de imunização. Outra revisão feita por Alving, 1992, relatou a influência da forma de acoplamento de antígenos ou haptenos na indução das respostas imunes. Os antígenos encapsulados no interior dos lipossomas requeriam macrófagos para iniciar a estimulação das respostas, porém quando localizados na superfície das vesículas, tinham seus epítopes mais expostos resultando em diferentes isotipos de produção de anticorpos. Quando antígenos altamente purificados foram utilizados, a composição lipídica mostrou-se também um parâmetro de indução de respostas imunes, além da estrutura (unilamelar ou multilamelar). Essas propriedades físicas e a localização dos antígenos nas vesículas de lipossomas determinam a sua adjuvanticidade. Menor toxicidade foi observada e várias possibilidades de formulações preparadas com a introdução de outros imunoadjuvantes foram investigadas no sentido de obtenção de respostas mais intensas. Vários antígenos protéicos e peptídicos fornecem diversos modelos de apresentação aos APC's e de respostas imunes variadas, podendo ocorrer a indução de anticorpos diretamente pelos linfócitos B ou através dos linfócitos T que posteriormente ativam as células B, ou então a indução dos linfócitos T citotóxicos por outro mecanismo (imunidade celular).

Em 1992 Fries e col., desenvolveram uma vacina contra a malária usando lipossomas preparados na razão molar 0,9:0,1:0,75 de Dimiristoilfosfatidilcolina:Dimiristoilfosfatidilglicerol:Colesterol, e MPLA (lipídio A ou monofosforil lipídio

A) encapsulando a proteína recombinante R32NS1₈₁ contendo epítopes característicos da região principal (circumporozóide) do *Plasmodium falciparum*. Os testes clínicos foram feitos com humanos, através da via intramuscular. Observou-se que anticorpos específicos IgG relativos a essa proteína recombinante foram produzidos em altas quantidades quando a proteína estava na forma incorporada (tanto no seu interior como na superfície). Não foi observado reatividade ou toxicidade, concluindo-se que a associação dessa proteína com lipossomas constituía uma excelente estratégia para imunização contra a malária, com a indução de anticorpos específicos. Resultados semelhantes foram obtidos por Just e col., 1992 no desenvolvimento de uma vacina contra a hepatite A, com vírus mortos da série RG-5B, inativados com formaldeído, e incorporados aos lipossomas (superficialmente e encapsulados). Bons resultados foram obtidos, em termos de estabilidade e grande capacidade de indução das respostas imunes, além de baixa toxicidade.

Lopes e Chain, 1992 pesquisaram e mostraram que antígenos solúveis livres são pobres ativadores de células T citotóxicas, mas quando incorporados aos lipossomas tornavam-se fortes estimuladores destas células (citotoxicidade específica). Nesse trabalho utilizou-se como antígeno protéico a proteína ovoalbumina para ser incorporada em lipossomas multilamelares (método de hidratação do filme seco de lipídios) (a) neutros; compostos por fosfatidilcolina (DSPC), lisofosfatidilcolina e colesterol na razão molar de 6,9:0,1:3,0, (b) carregados positivamente; preparados como em (a) com adição de estearilamina de razão molar de 6,9:0,1:2,0:1,0 e (c) carregados negativamente; preparados como em (a) com adição de dicetil fosfato de razão molar 6,9:0,1:2,0:1,0. Observou-se que havia grande indução de células T citotóxicas em todos os casos, servindo como estimuladores de citotoxicidade específica. Os ensaios de imunidade foram feitos em camundongos em injeções com intervalos de 3 semanas pela via intravenosa, primeiro com ovoalbumina livre e encapsulada aos diversos tipos de lipossomas. Nas suposições, dos autores, as respostas de células T citotóxicas foram mediadas por células de efeito CD8⁺ as quais reconheceram o antígeno na superfície das células “alvo” associadas com as moléculas MHC de classe I. Os autores concluíram que antígenos exógenos endocitados por células estimuladoras e processados se ligaram às moléculas de classe II, e os antígenos endógenos sintetizados foram processados e ligados predominantemente às moléculas de

classe I. Isso não impediu que peptídeos pequenos fossem processados pelas duas vias. Em todos os casos as células T citotóxicas foram produzidas, concluiu-se que a incorporação de antígenos protéicos em lipossomas ajudava a estimular tais respostas. Os autores acreditaram que houve uma fusão dos lipossomas com as células citolíticas de classe I, liberando os constituintes no compartimento citoplasmático resultando na estimulação das respostas citolíticas de classe I.

A incorporação de peptídeos nos lipossomas foi estudada com o objetivo de obter compostos imunogênicos. Os lipossomas preparados foram do tipo unilamelar com grupos maleimida na superfície e contendo o adjuvante monofosforil lipídio A. As vesículas foram liofilizadas e estocadas sem perda de atividade biológica e funcionalidade. Na rehidratação, peptídeos contendo grupos de cisteína foram ligados à superfície dos lipossomas produzindo conjugados imunes. Esses conjugados evitaram a utilização de carreadores protéicos e adjuvantes de Freud para o aumento de anticorpos contra os peptídeos. Os lipossomas foram preparados com os fosfolípidios: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e o colesterol (razão molar de 85:15:50) com os grupos maleimida colocados através do composto butirato de Succinimidil-4-(p-maleimidofenil). Os peptídeos utilizados tiveram as seguintes seqüências: CGIRGERA correspondendo ao carbono terminal do hexapeptídeo de histone H3 e o outro com seqüência SKRGP GSGF(KYC) que é um peptídeo cíclico correspondendo à região 139-147 da seqüência hemaglutinina do vírus influenza. Devido a problemas de perda de integridade no resfriamento e rehidratação das soluções de lipossomas no estoque alguns crioprotetores foram adicionados tais como: sacarose, trealose, glicerol, entre outros. Peptídeos acoplados na superfície com adjuvantes anfipáticos, ajudaram a diminuir esse problema, mas houve conversão de SUV's para MLV's e nesse caso promoveram mudanças na indução das respostas imunológicas as quais foram melhores em lipossomas unilamelares. Neste caso o sorbitol foi usado como crioprotetor o qual protegeu e manteve os grupos maleimida na estrutura externa dos lipossomas. Os ensaios de imunidade foram feitos com camundongos através da via intraperitoneal, as injeções ocorriam em intervalos de 3 semanas e as amostras coletadas ocorriam 5 dias após as administrações. Os tipos de anticorpos produzidos foram os mesmos quando utilizados peptídeos cíclicos em lipossomas recém

preparados e liofilizados dentro das condições citadas. A associação da proteína ovoalbumina a esses lipossomas promoveu menor intensidade nas respostas imunes (Friede e col., 1993).

O comportamento da liberação de proteínas “in vivo” e “in vitro” utilizando a proteína rhG-CSF derivada da bactéria *Escherichia coli* encapsulada em lipossomas oligolamelares, compostos por dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e colesterol (Col) na razão molar 1:4:5 foram estudados por Meyer e col., 1994. Experimentou-se quatro metodologias de preparação de lipossomas: (1) preparação através da passagem de uma corrente de nitrogênio e após dessecação à vácuo por 1 hora e conseqüente hidratação, a proteína não encapsulada foi removida por ultracentrifugação, (2) pulverização de lipídios secos, hidratados e microfluidizados como em (1) e a separação dos não encapsulados foi feita por diálise, (3) lipídios dissolvidos em clorofórmio e os finos filmes de lipídios eram preparados como em (1) e sonicada. As amostras sonicadas eram passadas por 5 ciclos de resfriamento (gelo seco/acetona) e aquecimento (37°C) e a seqüência dos passos ocorria como em (2), (4) mesmo procedimento em (3), sendo que os filmes de lipídios eram hidratados com água destilada e D-mannitol atingindo razão mássica 1:1 (D-mannitol:Lipídio Total). Após preparação as amostras eram tratadas como em (2) e (3). A capacidade de liberação da proteína foi feita em teste “in vitro” incubando a solução de lipossomas purificada do método (4) em soro humano 90% a 37°C, e a % de liberação foi analisada por fluorescência em tempos diferentes. Além dessa análise realizou-se injeções subcutâneas em camundongos e de tempos em tempos colhidos o sangue do animal para análise. Os autores concluíram que a melhor % de encapsulamento obtida foi aquela proveniente do método (4) 90%, seguido do (3) 80%, (2) 30% e (1) 2%. O primeiro método utilizando borbulhamento de nitrogênio foi ineficiente conduzindo a um baixo encapsulamento, já os ciclos de congelamento e descongelamento conduziram a um encapsulamento eficiente. Os lipossomas produzidos pelo método (4) não promoveram mudanças na estrutura e atividade da proteína rhG-CSF e um excelente comportamento de liberação da proteína nos testes “in vivo” e “in vitro” (liberação lenta). Todos esses métodos não provocaram desnaturação nem perda da atividade das proteínas.

Alving e col., 1995 verificaram em suas pesquisas a indução das respostas imunes com o uso de peptídeos acoplados, encapsulados ou na forma livre e a produção de anticorpos e linfócitos T citotóxicos. Em muitos casos foi observada uma efetiva imunização contra doenças complexas como o câncer, doenças parasíticas, AIDS, entre outras infecções virais. O uso de formulações contendo lipossomas e outros adjuvantes também foi estudado e em muitos casos a adição de MPLA (monofosforil lipídio A) aumentou a indução da formação de linfócitos T citotóxicos. A localização dos antígenos era muito importante na indução de respostas imunes. Os antígenos localizados na superfície induziram maior formação de anticorpos em relação à formação dos linfócitos T citotóxicos, mas em outros casos esse comportamento foi invertido.

A influência da composição fosfolipídica dos lipossomas nas respostas de anticorpos foram estudadas por Phillips e col., 1996, quando esses encapsulavam proteínas e peptídeos. Nesse trabalho observou-se as respostas de anticorpos IgG em camundongos (via subcutânea) quando era administrado solução de lipossomas encapsulando albumina de soro bovino (BSA), anticorpos murine monoclonal GK1,5 ou um peptídeo com 21 aminoácidos do segundo domínio do HIV gp120 depois da administração separadamente. Além desses antígenos foi também utilizado a glutationa-S-transferase (Sm28GST) do *Shistosoma manssoni* em administração oral. As respostas de anticorpos induzidas pelos lipossomas encapsulando esses antígenos foram comparados com outros adjuvantes como: N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutamina (MDP) e hidróxido de alumínio com os mesmos antígenos. Para administrações subcutâneas as formulações de lipossomas formadas por: DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina)/DMPG (dimiristoilfosfatidilglicerol) induziram a formação de 54-60% de anticorpos IgG₁ e 35-45% de IgG_{2a+2b}. Com DPPC/DPPE (dimalmitoilfosfatidiletanolamina) houve a indução de anticorpos de 73-78% de IgG₁ e 15-25% de IgG_{2a+2b}, DPPC/PS (fosfatidilserina) induziam 86-89% de IgG₁ e 8-12% IgG_{2a+2b}. A utilização de hidróxido de alumínio e MDP induziram 79-91% IgG₁ e 4-17% de IgG_{2a+2b}. A ordem de adjuvantividade observada na indução de anticorpos IgG foi a seguinte: lipossomas formados por DPPC/DMPG > DPPC/DPPE >> H.alumínio >> MDPDPPC/PS para todos os três antígenos encapsulados. Já os lipossomas DPPC/DMPG foram efetivos indutores de anticorpos de secreção IgA e anticorpos IgE e IgG contra o antígeno

Sm28GST depois da administração oral. A dificuldade das misturas de antígenos encapsuladas em lipossomas induzir respostas de anticorpos mostrou que a incorporação dos antígenos em lipossomas eram primordiais para atividade adjuvante.

Várias formulações de lipossomas foram pesquisadas por Nakanishi e col., 1997, como imunoadjuvantes encapsulando antígenos protéicos solúveis, relacionando com a carga superficial dos lipossomas. Vesículas multilamelares carregadas positivamente (MLV's) foram eficientemente tomadas e processadas pelos macrófagos enquanto que os lipossomas carregados negativamente e neutros não. Nesse trabalho foi encapsulada a proteína ovoalbumina (OVA) nos MLV's com carga positiva e assim funcionaram como fortes indutores de células T citotóxicas específicas e produção de anticorpos. Os fosfolípidios utilizados foram: fosfatidilcolina (PC), ácido L- α -dimiristoil fosfatídico (PA), e ainda nas formulações foram adicionados a estearilamina (SA), colesterol (Col), e a β -galactosidase. Para os lipossomas com carga positiva formados por (PC:Col:SA) as razões mássicas foram 4:5:1, para os carregados negativamente em substituição ao SA foi adicionado o PA com as mesmas razões do primeiro caso, e os lipossomas neutros com razão (PC:Col) foi de 1:1. Os resultados dos testes de imunidade foram feitos em camundongos (via peritoneal) Os resultados indicaram que lipossomas com carga positiva são importantes para o aumento da imunoadjuvanticidade na indução de respostas imunes específicas (LTC's e anticorpos) em comparação com os outros tipos de lipossomas (neutros e carregados negativamente) que pouco induziram as respostas imunes.

Freitas Jr., 1997, desenvolveu estudos sobre o encapsulamento em lipossomas unilamelares, de glicoproteínas alergênicas, na faixa de pesos moleculares compreendida entre 14 e 97 kDa, extraídas do corpo de ácaros da espécie *Blomia tropicalis*. No processo de encapsulamento com o extrato bruto, a quantidade de proteína encapsulada, expressa através da razão molar Proteína/Lipídio final, $(P/L)_{\text{final}}$, variou em até 61% com a razão Proteína/Lipídio inicial da solução de hidratação $(P/L)_{\text{inicial}}$ na faixa estudada de 2 a 5 mg/mL. Os valores máximos obtidos foram da ordem de 0,008 mg/mM com eficiência de encapsulamento de aproximadamente 0,7%. A máxima eficiência obtida, 1,1%,

correspondeu à razão $(P/L)_{\text{final}}$ 0,005 mg/mM. Os lipossomas foram compostos de 60% mol (DSPC) e 40% mol (Col). Os resultados mostraram que a utilização do extrato bruto com uma gama muito grande de tamanhos de proteínas dificultou o encapsulamento, a separação do material e as análises químicas. A presença do extrato protéico não alterou significativamente a estabilidade dos lipossomas nem mesmo com o tempo, devido principalmente ao caráter hidrofílico das proteínas e a baixa concentração protéica encapsulada.

Frézard, 1999 revisou trabalhos sobre as propriedades farmacológicas, biofísicas e estruturais dos lipossomas. Nesse trabalho foi proposto um mecanismo para ação imunoadjuvante dos lipossomas com as respectivas respostas humorais e celulares conforme apresentado na Figura 8.

Na indução de respostas imunes humorais o conjugado de lipossomas é tomado pelos macrófagos, sendo processado e ativando as células T e na sequência as células B produzindo anticorpos (em alguns casos as células B são ativadas diretamente). As repostas humorais podem ser aumentadas pela co-inclusão de imunoestimulantes como já visto anteriormente. Em antígenos superficialmente ligados na superfície dos lipossomas a imunidade pode ocorrer sem a participação dos macrófagos, que dependerá muito do tamanho deles, interagindo diretamente com os linfócitos B via um mecanismo alternativo.

Na indução das respostas imunes celulares ou mediada por células os antígenos são tomados pelos APC's (macrófagos), e sofrem um processamento específico em que fragmentos antigênicos são associados a um complexo glicoprotéico da classe I (CMH I) na superfície dos macrófagos, isto conduz uma proliferação de diferentes tipos de linfócitos T, chamados de linfócitos T citotóxicos (LTC) que são direcionadas contra infecções virais e células infectadas. A Figura 8 mostra a indução das respostas imunes quando os lipossomas atuam no sistema imune.

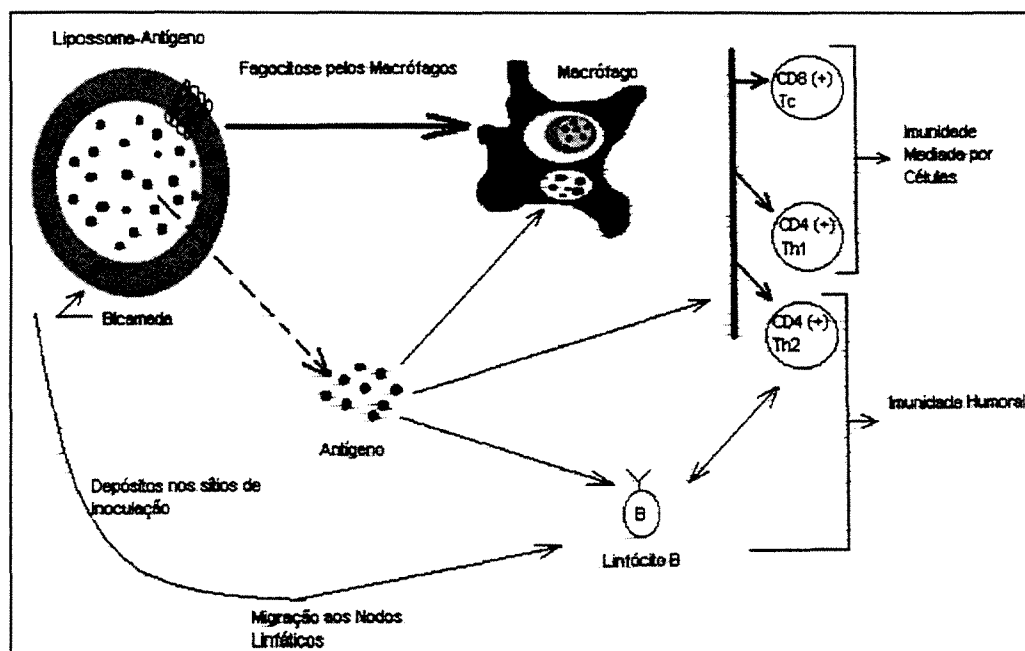


Figura 8 – Atuação dos lipossomas no sistema imunológico, envolvendo os dois tipos de respostas imune, humorais e mediada por células ou celulares. As respostas imunes são dependentes do tipo de antígeno que esteja presente (Adaptada de Frézard, 1999).

2.9) Estabilidade dos Lipossomas em Presença de Tensoativos

Edwards e Almegren, (1990) estudaram a estabilidade de lipossomas na presença de tensoativos, concluindo que a solubilização das vesículas depende do empacotamento da bicamada lipídica, e da concentração de tensoativo. O perfil típico de solubilização dos lipossomas pode ser dividido em três regiões características; a primeira na qual há um aumento insignificante do tamanho das vesículas, a segunda fase na qual, há um crescimento acentuado e agregação das vesículas, com o aumento da concentração de tensoativo, e a última fase com concentrações de tensoativo na ordem de 80% há desestruturação da bicamada com formação de micelas. Estas regiões são identificadas por medida de turbidez das soluções, ou do diâmetro médio das vesículas por espalhamento quase elástico de luz. Os mecanismos de interação dos lipossomas foram estudados através dos perfis de solubilização ou estabilidade dos lipossomas com tensoativos, e identificadas regiões de maior estabilidade das vesículas (Gregoriadis, 1990; 1993; Lasic, 1993,1994).

2.10) Comportamento dos Lipossomas “In Vivo”

Os lipossomas interagem com qualquer tipo de células e isso ocorre através de mecanismos de adsorção. As taxas de fluxo dos encapsulados dependem do tamanho e composição da membrana fosfolipídica, do tipo de agente encapsulado e natureza da célula (Ostro, 1987a). Após a adsorção ocorre a endocitose das vesículas lipídicas pelas células e troca de lipídios com a membrana celular, ficando o conteúdo aquoso no meio citoplasmático. Outra característica importante relativa aos lipossomas no comportamento "in vivo" são as interações com os fluidos biológicos.

Gregoriadis e col., 1987 em trabalhos de revisão destacaram alguns parâmetros como: a temperatura de transição de fases e a carga dos lipídios na influência da fluidez da bicamada lipídica e as interações específicas com os antígenos e lipoproteínas do sangue. Foi observado que as lipoproteínas podem desestabilizar a bicamada lipídica. Além destes parâmetros, o tipo de lipídio, de proteína ou peptídeo foram também considerados.

O plasma sangüíneo, devido a sua grande heterogeneidade, tem uma grande influência na estabilidade dos lipossomas devido à presença das lipoproteínas de alta densidade (HDL), fosfolipases, tensoativos e opsoninas, que podem adsorver com grande facilidade na superfície dos lipossomas desestabilizando a sua estrutura. Além dessas organelas e outros compostos, o pH, a força iônica e a presença de íons Ca^{+2} também interferem na estabilidade da bicamada fosfolipídica (Black e Gregoriadis, 1976; Lasic, 1993). As opsoninas, que são proteínas, promovem um rápido reconhecimento das vesículas pelo sistema imunológico, e a sua eliminação da corrente sangüínea. A remoção é feita por células especiais do sistema retículo endotelial (RES). Nesse processo as lipoproteínas adsorvem na superfície dos lipossomas desestabilizando a bicamada lipídica através de trocas de lipídios. Além dessas fosfolipases também contribuem para desestabilização da bicamada lipídica. Outras moléculas que adsorvem na superfície alteram a estabilidade das vesículas de lipossomas podendo também alterar a permeabilidade, tamanho e estrutura das vesículas (Nilsson e col., 1987; Ruiz e col., 1988;

Edwards e col., 1989; Edwards e Almgren, 1990; 1991;1992; Allen, e Cleland, 1980; Gregoriadis, 1993).

A composição química e as condições em que os lipossomas são preparados também podem influenciar com grande relevância a sua estabilidade em fluidos biológicos. Outros fatores tais como: surfactantes de cadeias simples, defeitos na estrutura e alto raio de curvatura nas vesículas, defeitos provenientes do empacotamento da bicamada lipídica, que podem ser minimizados com adição de colesterol e pela utilização de temperaturas acima da temperatura de transição de fase também contribuem para esse fato (Bonte e Juliano, 1986; Ostro, 1987a; Edwards e Almegren, 1990; Jones e Nicholas, 1991).

Para a estabilidade a composição lipídica é muito importante, e as interações dos lipossomas com as proteínas podem ser simples envolvendo cargas superficiais e/ou interações hidrofóbicas conduzindo a uma adesão ou adsorção dessas proteínas na superfície dos lipossomas ou a sua penetração na bicamada lipídica (Gregoriadis, 1990; 1993 e Lasic, 1993).

O efeito do colesterol na liberação dos solutos encapsulados como a transferência de lipídios para o HDL tem sido extensivamente estudado. A utilização deste esteróide fornece a capacidade de compactação das moléculas fosfolipídicas em uma bicamada fluídica, aumentando a estabilidade dos lipossomas. Em SUV's a adição de colesterol provoca uma estabilização das vesículas em plasma em comparação com aquelas que não possuem o esteróide (Kirby e col., 1980; Allen, 1984; Damen e col., 1981). Embora quantidades de colesterol nas vesículas possam protegê-las contra a liberação do soluto em plasma ou a penetração de outras substâncias, a perda dos fosfolipídios de lipossomas não pode ser inteiramente prevenida, ocorrendo trocas de lipídios com o HDL. Damen e col., 1981, observaram que as interações de HDL plasmático com lipossomas ricos em colesterol é superficial com a troca de fosfolipídios. Observações “in vitro” nas interações dos lipossomas com o plasma podem ser influenciadas pelas mudanças de pH, que é determinante para o grau de protonação de compostos encapsulados e em consequência altera a taxa de difusão através da bicamada lipídica. O aumento de pH, em determinados

casos, pode diminuir ou aumentar a liberação dos encapsulados afetando a estabilidade das vesículas. Em compostos sensivelmente protonados foi observado uma dificuldade na liberação dos fosfolipídios de lipossomas não sendo influenciado por mudanças moderadas no pH.

A molécula de Mioglobina com peso molecular de 18,8 kDa, apresenta uma conformação compactada com poucas interações entre as moléculas, ficando as cadeias não polares juntas através de uma série de interações de Van der Waals contribuindo significativamente nas interações hidrofóbicas. Grupos heme se encontram em frestas em forma de bolsas na estrutura da molécula, ficando o átomo de ferro no centro desse grupo possuindo duas ligações coordenadas perpendiculares ao plano do grupo heme, ficando uma dessas ligações com o grupo hidrofóbico do resíduo His ligado e a outra funcionando como um sítio de ligação, no qual a molécula de O_2 é devidamente ligada. Dentro dessas bolsas a acessibilidade do grupo heme para solventes é muito restringida. Essa situação é muito importante para a função que a mioglobina tem no transporte de O_2 no músculo provendo suprimento de reserva de O_2 e facilitando o movimento desse gás dentro dos músculos. Ficando os grupos heme livres em soluções oxigenadas o processo de oxidação ocorre rapidamente. Neste caso a forma ferrosa Fe^{+2} , que é mais ativa na ligação reversível com a molécula de O_2 , ocorre passando para a forma férrica Fe^{+3} que não se liga a essa molécula. As dimensões dessa proteína com forma próxima a esférica são de $44 \times 44 \times 25$ Å. Várias representações da estrutura da mioglobina são apresentados na Figura 10.

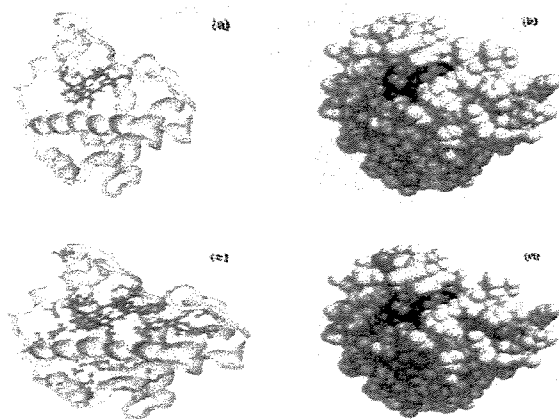


Figura 10 – Molécula de Mioglobina. As bases polipeptídicas são mostradas nas fitas (estrutura secundária), As regiões α -helicoidais são evidentes. (b) Modelo espacial (tridimensional) mostrando os grupos heme escondidos (em vermelho), todas as cadeias de aminoácidos estão incluídas. (c) A representação das tiras incluindo as cadeias laterais (roxo) para os resíduos hidrofóbicos Leu, Ile, Val, e Phe. (d) Modelo espacial com todas as cadeias laterais de aminoácidos, os resíduos hidrofóbicos estão mostrados em roxo, mas muitos não são visíveis por estarem escondidos no interior da proteína.

2.11) Aspectos Relevantes das Proteínas Encapsuladas

As proteínas Albumina de Soro Bovino, Mioglobina e Citocromo C, consideradas proteínas de transporte possuem estrutura globular. A BSA foi estudada com detalhes por Carter e Ho, 1994 que foi reconhecida como a principal proteína bovina do sangue, sendo a mais abundante. É uma proteína responsável pela pressão osmótica e manutenção do pH sanguíneo. Possui peso molecular de 66,7 kDa, alto grau de flexibilidade conformacional, possuindo várias formas isoméricas que podem ser induzidas reversivelmente em função do pH. As variadas formas isoméricas podem conduzir a heterogeneidade nas interações com outros compostos (fosfolipídios, lipoproteínas, etc). Sua estrutura se aproxima a uma esfera (elipsóide) com dimensões de 60x45x37 Å. Na Figura 9 são mostradas estruturas do BSA.

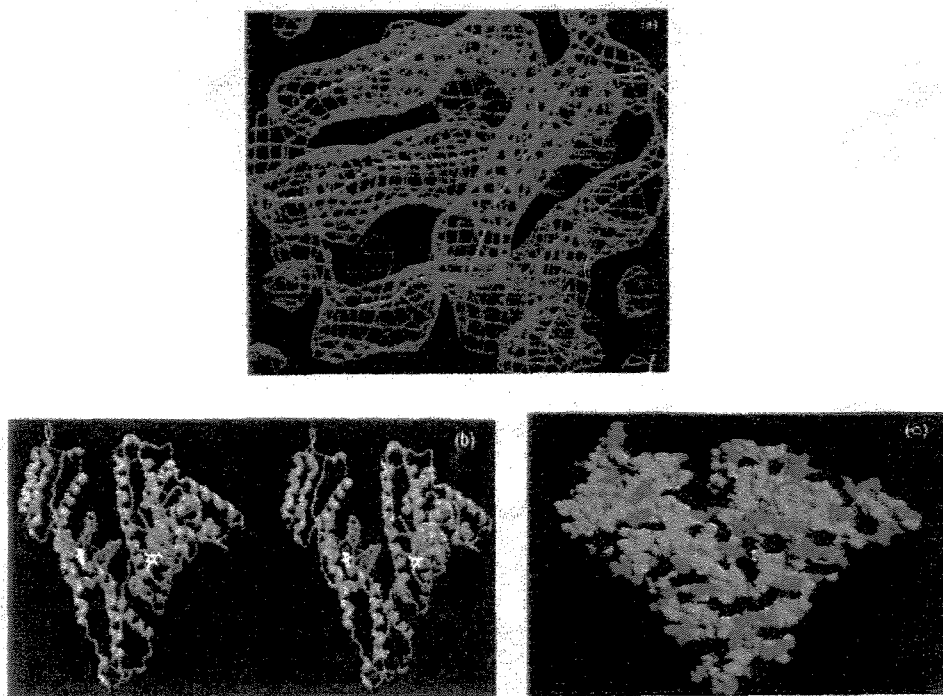


Figura 9 – Molécula de BSA. (a) Hastes helicoidais de densidade de 8 a 10 Å em diâmetro, indicativo da estrutura α -helicoidal (características dominantes da densidade eletrônica). (b) Estrutura secundária, possuindo 28 hélices tendo de 5 a 31 aminoácidos em comprimento podendo ser agrupados em dentro de 10 hélices principais dentro de cada domínio. (c) Modelo espacial da molécula de BSA, com os resíduos básicos em azul, resíduos ácidos em vermelho e os neutros em amarelo.

A proteína Citocromo C é muito semelhante à molécula de mioglobina, sendo menor, com peso molecular de 12,3 kDa. Essa proteína tem função específica na cadeia respiratória das mitocôndrias. Verifica-se na sua estrutura que 40% do polipeptídeo está no segmento α -helicoidal comparado com 80% na cadeia da mioglobina, o restante das cadeias possuem dobras e irregularidades com segmentos estendidos diferindo na estrutura. As dimensões da molécula de citocromo C é de 25x25x37 Å. Na Figura 11 são apresentadas duas representações da configuração dessa proteína.

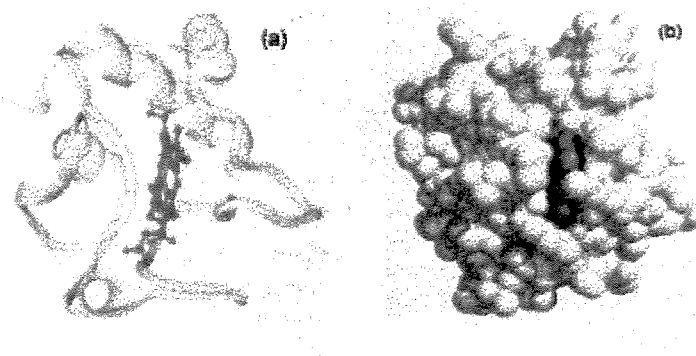


Figura 11 – Molécula de Citocromo C. Duas representações são mostradas: a representação em tiras espirais e o modelo espacial. Nas representações em tiras as estruturas β estão representadas por setas planas e a α -hélice na forma de tiras espirais, a orientação em cada caso é a mesma.

*Capítulo III – Material e Métodos***3.0) Material e Métodos****3.1) Material**

Os lipídios usados na preparação dos lipossomas foram: L- α -distearoilfosfatidilcolina (DSPC) (C18:0), de peso molecular 790,2 g/gmol, dimiristoilfosfatidiletolanamina (DMPE), de peso molecular 635,9 g/gmol, e colesterol (Col) 5 α ,6 α -Epóxido, de peso molecular 402,7 g/gmol da Sigma Chemical CO. Os solventes clorofórmio de peso molecular 119,5 g/gmol e o metanol, de peso molecular 32,0 g/gmol, da Merck Chemical CO.

As proteínas utilizadas no encapsulamento foram a Albumina de Soro Bovino (BSA), de peso molecular 66,7 kDa, Mioglobina (Mio) de coração de cavalo, pureza de 97% com 0,30% de ferro, de peso molecular 18,8 kDa e o Citocromo C (Cit C) de coração de boi, tipo V-A, de pureza de 99% e peso molecular 12,3 kDa, todas produzidas pela Sigma Chemical CO.

Os reagentes usados no ensaio de determinação de proteínas pelo Método do Ácido Bicincônico (BCA), foram: 4',4' dicarboxil-2',2'-biquinolina (ácido bicincônico), (Sigma Chemical CO.), carbonato de cálcio, bicarbonato de sódio e sulfato de cobre pentahidratado, (Merck Chemical CO.), tartarato de sódio e hidróxido de sódio (Libisynth Produtos para Laboratório Ltda., e Quimibrás Industria Química S/A), respectivamente.

Para a determinação de proteínas pelo Método de Lowry Modificado (Ensaio Hartree), os reagentes foram: Fenol Folin Ciocalteau, (Química Especializada Erich Ltda.) (EEL), tartarato de sódio e potássio (sal de Seignette), (Ecibra), hidróxido de sódio (Reagen-Quimibrás Indústrias Químicas S/A), sulfato de cobre anidro e carbonato de sódio anidro (Merck Chemical CO).

As determinações do teor de fosfolipídios nos lipossomas foram feitas usando os seguintes reagentes: ácido sulfúrico, (Química Especializada Erich Ltda.), molibdato de

amônio (Ecibra Indústria e Comércio de Produtos Químicos Ltda.), ácido L-ascórbico (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda.) e peróxido de hidrogênio (Merck Chemical CO).

Os dois tipos de gel utilizados no processo de separação por cromatografia de permeação em gel foram: Sephadex G-100, e a Sepharose CL-6B (Sigma Chemical CO).

O reagente 1-octanol foi usado nos ensaios para a determinação do coeficiente de partição das proteínas no sistema octanol/água (Merck Chemical CO).

Em todas as preparações foi usado o tampão HEPES ((N-[2-hidroxietil] piperazina-N'-[2-[2-ácido etanosulfônico]]), (Merck Chemical CO). A água usada nos experimentos foi destilada e microfiltrada no sistema MILLI-Q a 18,2 MΩCM da Millipore Indústria e Comércio Ltda.

Para o ensaio de modificação na superfície dos lipossomas foram usados periodato, etileno glicol, citrato de sódio e boro hidratado de sódio (Sigma Chemical CO).

3.2) Equipamentos

Os equipamentos utilizados neste trabalho foram: Balança Scientech SA 210, pH metro da Oakton série 35616.

Para a preparação dos lipossomas utilizou-se evaporador rotatório Art. Lab, com balão volumétrico de 50 mL, em banho Yamato RE52. O banho de refrigeração com recirculação externa foi fabricado pela TECNAL-TE-184.

A extrusão dos lipossomas multilamelares foi feita em equipamento fabricado pela Lipex Biomembranes INC, equipado com filtros de policarbonato da Nuclepore de 100 nm

de diâmetro. O gás utilizado na extrusão foi o Nitrogênio, com 99% de pureza, (White Martins).

Nos processos de separação foram utilizadas colunas de 45 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro (Sigma Chemical CO). O processo de Ultrafiltração foi conduzido em célula de 50 mL, modelo 8050 (Amicon), com membranas de diâmetro de corte de 100, 50 e 10 kDa, para as devidas separações. A membrana com diâmetro de corte de 100 kDa foi utilizada na separação dos lipossomas, a de 50 kDa separava a proteína BSA (PM 66,7 kDa) e a de 10 kDa foi utilizada na separação da mioglobina (PM 18,8 kDa) e Citocromo C (PM 12,327 kDa).

Todas as leituras espectrofotométricas realizadas nos ensaios de determinação do teor de fosfolípidios e de proteínas foram feitas em Espectrofotômetro modelo U-2001 (Hitachi).

Para os ensaios de estabilidade foram utilizados os seguintes equipamentos : leitora do tipo Elisa (Microtiter Plate Reader), modelo EL312e, da Bio-Tek Instruments Inc., e espectrofotômetro modelo U-2001 (Hitachi).

A análise de distribuição de tamanhos foi realizada no equipamento de detecção de espectro Malven Autosizer, modelo 4.700 da Malvern Inst. Ltda.

Para a separação dos lipossomas no processo de associação de mistura de proteínas à superfície dos lipossomas foi utilizada a coluna Econo-Pac 10D6 da Bio-Rad.

3.3) Métodos Experimentais

3.3.1) Coeficiente de Partição das Proteínas

O conhecimento do coeficiente de partição das proteínas em sistema hidrofílico/hidrofóbico permite a predição da localização das proteínas na estrutura dos lipossomas. De acordo com o grau de hidrofiliicidade, as proteínas podem se localizar na superfície, no cerne aquoso, ou na bicamada lipídica. Para a determinação do coeficiente de partição das proteínas foi usado o sistema octanol/água conforme metodologia descrita por Moraes, 1996.

Em um tubo de ensaio colocava-se 1,0 mL da solução aquosa de proteína a ser analisada, na concentração 1mg/mL. e 1,0 mL de octanol puro agitando-se vigorosamente a mistura por 5 minutos e deixando-a em seguida em repouso por 1 hora para garantir a partição total das proteínas nas duas fases. Após esse período a mistura era centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm, em centrífuga Eppendorf, para a separação das fases. As proteínas presentes na fase hidrofílica, foram quantificadas pelo ensaio de Lowry Modificado.

O coeficiente de partição foi determinado pela equação 2:

$$C_p = \frac{C_{p_i} - C_{p_f}}{C_{p_f}} * 100 \quad (2)$$

Onde C_p é o coeficiente de partição, C_{p_i} a concentração inicial de proteínas e C_{p_f} a concentração final de proteínas na fase aquosa.

3.3.2) Preparação dos Lipossomas

Os lipossomas multilamelares foram preparados com o lipídio distearoilfosfatidilcolina (DSPC), e colesterol (Col), na razão molar 70:30 (DSPC: Col), e na preparação dos lipossomas do mesmo tipo utilizados no processo de associação covalente de proteínas em mistura à superfície das vesículas adicionou-se o fosfolipídio dimiristoilfosfatidiletanolamina (DMPE) à formulação, tendo razão molar de 60:20:20 de (DSPC:Col:DMPE). O método da hidratação do filme seco de lipídios foi utilizado na preparação dos lipossomas.

3.3.2.1) Método de Hidratação do Filme Seco de Lipídios

Inicialmente os lipídios foram dissolvidos em solução de clorofórmio e metanol na razão molar 9:1 (Clorofórmio:Metanol), em balão volumétrico de fundo redondo. Em seguida foi realizada a evaporação do solvente a vácuo, em evaporador rotatório, com a seguinte programação: oito minutos à temperatura ambiente numa rotação de 20 rpm, seguidos de cinco minutos à temperatura de 70 °C e rotação de 20 rpm, elevando-se a rotação para o valor máximo do equipamento (evaporador rotatório) nos 10 minutos finais.

A hidratação do filme seco de lipídios formado no fundo do balão foi feita com tampão HEPES (10 mM e pH 7,4), ou soluções de proteínas. Para o encapsulamento de proteínas individuais as soluções de hidratação possuíam concentrações totais que variavam de 2,0 a 8,0 mg/mL (Apêndice 3), já para as misturas de proteínas, foram utilizadas misturas com concentrações totais de 1,36 mg/mL e 3,50 mg/mL ambas com razões molares de 20:40:40; 40:20:40 e 40:40:20 de (Cit C:Mio:BSA) solubilizadas no referido tampão, à temperatura de 60 °C durante 30 minutos à velocidade de rotação máxima do equipamento.

A temperatura e tempo de hidratação foram escolhidos de modo a não produzir a desnaturação das proteínas. Para facilitar a remoção do filme e melhorar o rendimento da preparação, procedia-se a raspagem do fundo do balão com bastão apropriado. Os

lipossomas multilamelares formados foram deixados em repouso por 2 horas à temperatura ambiente, antes de serem submetidos à sonicação.

3.3.2.2) Homogeneização dos Lipossomas

Os lipossomas multilamelares previamente preparados foram sonicados em banho à temperatura ambiente por 30 minutos para uma melhor homogeneização da solução. Para a produção de lipossomas unilamelares os lipossomas multilamelares foram submetidos à extrusão em membranas de policarbonato de 100 nm de diâmetro de poros, com 15 passagens à temperatura de 60 °C e pressão de 15 kgf/cm².

3.3.3) Separação dos Lipossomas das Proteínas não Encapsuladas

Para a separação dos lipossomas das proteínas não encapsuladas foram testados dois métodos: cromatografia por permeação em gel e ultrafiltração.

3.3.3.1) Cromatografia por Permeação em Gel

A cromatografia por permeação em gel foi feita em coluna de 45 cm de altura e 2,5 cm em diâmetro, usando os géis Sephadex G-100 e Sepharose CL-6B. Esses géis possuem diâmetros de corte equivalentes ao fracionamento de compostos de pesos moleculares da ordem de 1-100 kDa e 10-4000 kDa, respectivamente.

As colunas foram empacotadas com os géis, lavadas com água destilada e tampão HEPES, e em seguidas saturadas com fosfolipídios para garantir a integridade dos lipossomas no processo de separação. Para reduzir as interações proteína-gel passou-se também através da coluna uma solução de BSA (2,0 mM). Para a separação, utilizou-se um volume de 2,0 mL da amostra contendo lipossomas e proteínas não encapsuladas, colocados no topo da coluna com pipeta Pasteur em movimentos circulares para garantir a formação de uma banda uniforme durante a eluição.

da mostra no gel. As frações eluídas foram coletadas em tubos usando um coletor automático modelo 2128 (Bio Rad), com volume ajustado para 3,0 mL (85 gotas/tubo). Em seguida, a absorbância das soluções foi lida em espectrofotômetro a 340 nm, para a identificação das frações contendo os lipossomas.

3.3.3.2) Ultrafiltração

Para a separação por ultrafiltração foi usada uma célula de 50 mL. A ultrafiltração da solução foi feita através de membranas de policarbonato com diâmetro de corte especificado para 100 kDa, com nitrogênio gasoso à pressão máxima de 5,4 Kgf/cm².

A célula foi alimentada com 2 mL de solução contendo lipossomas e proteínas não encapsuladas, completando-se o volume para 10 mL com tampão HEPES (10 mM e pH 7,4). A célula era conectada à linha de gás procedendo-se a ultrafiltração, com agitação magnética da solução, até a redução de 50% do volume inicial. Em seguida foram feitas três lavagens sucessivas, completando-se o volume até 10 mL com tampão HEPES, para garantir a remoção das proteínas livres da membrana e da solução de lipossomas.

Esse mesmo sistema foi usado com a membrana de diâmetro de corte equivalente a 10kDa para a concentração das proteínas filtradas (anteriormente separadas das soluções de lipossomas) antes da sua quantificação.

3.3.4) Caracterização dos Lipossomas

Após a remoção das proteínas não encapsuladas, as soluções ricas em lipossomas foram submetidas às análises de teor de fosfolipídios, e distribuição de tamanhos e diâmetro médio das vesículas.

3.3.4.1) Determinação do Teor de Fosfolipídios

A determinação do teor total de lipídios nas vesículas foi feita pela análise quantitativa dos íons fosfato (PO_4^{3-}) em solução, segundo metodologia desenvolvida por Chen Jr, e col., 1956, com modificações introduzidas por Moraes, 1996 e Ribas, 1997. Em linhas gerais o método consiste na digestão dos fosfolipídios com ácido sulfúrico concentrado e redução do fosfato a fósforo elementar. Em etapas subsequentes o fósforo elementar é oxidado a ortofosfato, formando um complexo com o molibdato de amônio, o qual é reduzido pelo ácido ascórbico resultando no aparecimento de coloração azul, cuja intensidade é proporcional à concentração de fosfato na amostra analisada. A determinação da concentração de fosfolipídios é feita através de curva de calibração previamente construída, usando padrões fosfato e fosfolipídios de concentrações conhecidas. A partir da concentração de fosfolipídios determina-se o teor total de lipídios na amostra através da proporção entre os fosfolipídios e os outros lipídios usada na preparação inicial.

Procedimento Experimental

Soluções-padrão, com concentrações conhecidas de fosfato inorgânico e orgânico foram preparadas na faixa de concentração de 0,2 mM a 2,7 mM. Em tubos de ensaio Pyrex de parede grossa foram adicionados tres esferas de vidro e 100µL das soluções-padrão e das amostras a serem analisadas, em duplicata. Em seguida adicionou-se 500 µL de H_2SO_4 10 N em cada tubo, submetendo-os a aquecimento à temperatura na faixa de 200-50 °C, por 30 minutos. Após esse tempo os tubos foram removidos da placa de aquecimento e resfriados até a temperatura ambiente. Adicionou-se então em cada tubo

165 µL de água oxigenada a 30% livre de fosfato, retornando os tubos ao aquecimento por mais 30 minutos, na mesma faixa de temperatura. Após resfriamento à temperatura ambiente adicionou-se em todos os tubos 4mL de água deionizada e 500 µL de uma solução aquosa de molibdato de amônio $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 0,02 mg/mL, agitando-se vigorosamente em vortex. Em seguida foram adicionados aos tubos 500 µL de uma solução aquosa de ácido ascórbico a 0,08 mg/mL submetendo-os novamente à agitação vigorosa. As soluções foram aquecidas a 100 °C em banho de água em ebulição por 7 minutos e após este tempo resfriadas até a temperatura ambiente para proceder-se as leituras das suas absorbâncias a 830 nm. A concentração molar total de lipídios nas amostras foi calculada dividindo-se a concentração de fosfolipídios determinada pela curva de calibração pela fração molar de fosfolipídios na amostra inicial, para levar em conta a presença do colesterol nas amostras. No apêndice 1 é apresentada uma curva de calibração típica da análise de fosfolipídios.

3.3.4.2) Determinação do Raio Hidrodinâmico e Distribuição de Tamanho dos Lipossomas

Para a determinação do raio hidrodinâmico e da distribuição de tamanhos dos lipossomas, foi utilizado o método de Espectroscopia de Espalhamento Quase Elástico de Luz (“Quasi-Elastic Light Scattering”-QLS) de comprimento de onda determinado (633 nm) obtida por incidência de raios laser. Esse método baseia-se na determinação do coeficiente de difusão médio translacional dos lipossomas em solução diluída, através de medidas das flutuações da intensidade do espalhamento de luz em função do tempo (Ford, 1985). Considerando as vesículas esféricas e em movimento Browniano, o raio hidrodinâmico médio, R_h , pode ser calculado pela equação de Stokes-Einstein.

$$R_h = \frac{(KT)}{6\pi D\mu} \quad (3)$$

Onde R_h é o raio hidrodinâmico, k é a constante de Boltzman, D é o coeficiente de difusão translacional, μ a viscosidade do meio, e T é a temperatura absoluta. Os resultados foram expressos em termos de diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas. Nos apêndices (Apêndice 4) encontramos os relatórios de análise dos raios hidrodinâmicos e distribuição de tamanhos.

3.3.5) Determinação da Concentração de Proteínas

As concentrações das proteínas individuais e em mistura foram determinadas através da curva de calibração da proteína BSA tomada como padrão e utilizada em todas as quantificações. As curvas de calibração referentes às proteínas Mioglobina e Citocromo C não promoveram diferenças significantes em relação às concentrações das amostras, não sendo utilizadas.

3.3.5.1) Método do Ácido Bicincônico (BCA)

O método do ácido bicincônico (BCA), segundo Smith e col., 1985, baseia-se na redução dos íons cobre em decorrência da formação de um complexo com as proteínas presentes, em pH 11,25. A forma iônica Cu^{+1} reage posteriormente com o ácido bicincônico (BCA), formando um complexo de cor púrpura cuja intensidade é proporcional à concentração de proteína na solução.

Procedimento Experimental

Inicialmente preparou-se 50 mL de uma solução aquosa designada por A, contendo 0,5 g de BCA, 1,0 g de carbonato de sódio, 0,08 g de tartarato de sódio, 0,2 g de hidróxido de sódio, 0,475 g de bicarbonato de sódio. O pH dessa solução foi ajustado em 11,25. Uma outra solução aquosa designada por B foi preparada com sulfato de cobre penta hidratado na concentração 0,004 mg/mL. Uma terceira solução, C, foi preparada misturando-se 2 mL da solução B com 100 mL da solução A. Para a quantificação das proteínas adicionou-se

aos tubos de ensaio 1 mL da solução C e 20 µL de amostra aquecendo-se em seguida à temperatura de 60 °C durante 30 min. A intensidade de cor foi determinada através de leituras da absorbância das soluções feitas em espectrofotômetro no comprimento de onda 560 nm, tendo a solução C como referência. A curva padrão foi construída com concentrações conhecidas de BSA na faixa de 0,2-1,0 mg/mL com amostras em duplicata.

Esse método foi usado somente para a determinação da concentração de proteínas no processo de encapsulamento de BSA em lipossomas unilamelares. No Apêndice 2 são apresentadas as curvas de calibração para os ensaios de BCA e Hartree.

3.3.5.2) Método de Lowry Modificado-Ensaio Hartree

O método de Lowry modificado, que constitui o ensaio Hartree (Hartree, 1972), baseia-se na desnaturação das proteínas e formação de complexo colorimétrico com reagente de Folin Ciocalteu. Esse método apresenta a vantagem de fornecer a mesma coloração para diferentes proteínas. Observou-se que o ensaio Hartree é totalmente satisfatório quando utilizadas as proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C utilizando como padrão a proteína BSA na curva de calibração.

Procedimento Experimental

Inicialmente preparou-se 1 litro de uma solução aquosa, designada por A, composta de 2,0 g de tartarato de potássio e sódio e 100 g de carbonato de sódio, ambos dissolvidos em 500 mL de NaOH 1,0 N, levando-se o volume final para 1L com água deionizada. Essa solução é responsável pela quebra das proteínas e exposição dos seus sítios para a formação dos complexos coloridos.

Uma outra solução aquosa, B foi preparada com 2,0 g de tartarato de potássio e sódio, 1,0 g de sulfato de cobre penta hidratado ambos dissolvidos em 90 mL de água deionizada e 10 mL de NaOH 1,0 N. Essa solução funciona como corante.

A solução C é composta do reagente de Folin Ciocalteau diluído em água deionizada na proporção de 1:15 (reagente:água). Essa solução não deve ser armazenada.

Nos tubos de ensaio em duplicata foram colocados 8, 16, 32, 50 μL da solução padrão de BSA (2,25 mg/mL) e 20 μL das amostras, e o volume total levado a 1mL com água deionizada. As soluções de referência, os brancos, foram preparados com 1,0 mL de água deionizada (sem as amostras). Em seguida foram adicionados 0,9 mL da solução A e os tubos colocados em banho maria à 56,0 °C por 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, adicionou-se 100,0 μL da solução B incubando-se por 10 minutos à temperatura ambiente, e por último adicionou-se 3,0 mL da solução C agitando-se vigorosamente. Os tubos foram aquecidos a 56 °C por 10 minutos e posteriormente resfriados à temperatura ambiente. A leitura em espectrofotômetro foi feita a 650 nm e a concentração das proteínas determinada a partir da curva de calibração construída. No apêndice 3 são apresentadas as curvas de calibração para as proteínas Mioglobina e Citocromo C. Esse ensaio foi utilizado para a quantificação de proteínas em todas as preparações de lipossomas multilamelares.

3.3.5.3) Determinação da Concentração das Proteínas Encapsuladas

A determinação quantitativa das proteínas encapsuladas foi feita após o rompimento dos lipossomas com Triton X-100 (0,6 mM), pelos métodos do ácido bicinônico (lipossomas unilamelares) e de Lowry-Modificado (lipossomas multilamelares), de acordo com os procedimentos já descritos anteriormente.

As proteínas encapsuladas foram expressas em relação a razão molar proteína/lipídio $(P/L)_{\text{final}}$. A eficiência (ou percentagem) de encapsulamento foi determinada por %E e calculada pela razão entre as relações molares (P/L) final e inicial, de acordo com a equação (4):

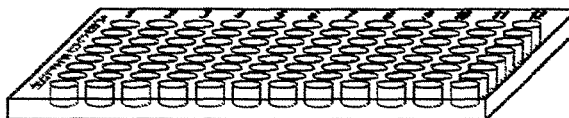
$$\%E = \frac{(P/L)_{final}}{(P/L)_{inicial}} * 100 \quad (4)$$

3.3.6) Estabilidade de Lipossomas em Tensoativo não Iônico e em Plasma Humano

Os ensaios de avaliação de estabilidade foram realizados de duas formas com duas horas de incubação com tensoativo pentaetilenoglicol mono-n-dodecil éter ($C_{12}E_5$) e em plasma humano em várias concentrações e realizado em tempos maiores em relação ao plasma (6 dias). O tensoativo foi diluído em tampão HEPES 10 mM e pH 7,4, com concentração variando de 0 até 100%. O aumento de tamanho das vesículas, decorrente da instabilidade, foi monitorado através de medidas da turbidez das soluções expressa em absorbância lida à 340 nm, usando uma leitora do tipo Elisa (Microtiter Plate Reader), modelo EL312e da Bio-Tek Instruments Inc. Todas as medidas foram realizadas quando as soluções se encontravam em estado estacionário após duas horas de incubação à temperatura ambiente, procedendo-se agitação por 1 minuto, no próprio equipamento antes das leituras. A concentração de tensoativo foi calculada pela equação 5. Em todas as situações, a concentração de lipossomas foi mantida constante em 1mM, e usados 120 μ L de solução de tensoativo e 80 μ L de solução de lipossomas 2,5 mM. A disposição das soluções de tensoativos e/ou plasma nos vários pocinhos da placa é mostrada na Figura 12. Para construção dos perfis de solubilização das vesículas em função da concentração de tensoativo, foram tomadas para cada concentração, a média das absorbâncias relativas às três medidas subtraída da absorbância do branco tomado como referência.

$$\% \text{ Tensoativos} = \frac{\text{Moles}(\text{tensoativo})}{\text{Moles}(\text{tensoativo}) + \text{Moles}(\text{lipídios})} * 100 \quad (5)$$

A Figura 12 mostra a placa de poliestireno e a distribuição das concentrações de tensoativo.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	br0	0 %	0 %	0 %	br3	3 %	3 %	3 %	br5	5 %	5 %	5 %
B	br7	7 %	7 %	7 %	br10	10%	10%	10%	br15	15%	15%	15%
C	br20	20%	20%	20%	br25	25%	25%	25%	br30	30%	30%	30%
D	br35	35%	35%	35%	br40	40%	40%	40%	br45	45%	45%	45%
E	br50	50%	50%	50%	br55	55%	55%	55%	br60	60%	60%	60%
F	br65	65%	65%	65%	br70	70%	70%	70%	br75	75%	75%	75%
G	br80	80%	80%	80%	br85	85%	85%	85%	br90	90%	90%	90%
H	br93	93%	93%	93%	br96	96%	96%	96%	br100	100%	100%	100%

Figura 12 - Placa para o ensaio de estabilidade, e a disposição das soluções de tensoativo nas várias concentrações. A designação br refere-se aos brancos tomados como referência, nos quais os lipossomas foram substituídos por água.

Os ensaios de estabilidade dos lipossomas em plasma humano foram feitos inicialmente com o mesmo procedimento anterior, substituindo-se o tensoativo $C_{12}E_5$ por plasma humano, e posteriormente com um volume maior de solução em cubetas (na análise de tempos maiores). A turbidez das soluções foi monitorada durante 6 dias à temperatura de aproximadamente 30 °C. Foram preparadas soluções de plasma humano nas concentrações de 10, 30, 100% diluídos em HEPES 10 mM e pH 7,4. De acordo com o ensaio de estabilidade feito em placas (Elisa), onde 40% do volume de cada pocinho era preenchido pelas soluções de lipossomas, esse mesmo valor foi utilizado para o ensaio de estabilidade por tempo. Foram preparadas três soluções com volume total de 5,0 mL adicionando-se: 3,0 mL das soluções de plasma previamente preparadas e 2,0 mL de solução de lipossomas (40% do total em volume da solução final de incubação) encapsulando mistura de proteínas preparada (concentração hidratação total de 1,36 mg/mL com a proporção 40:20:40 de (BSA:Mio:CitC).

Os resultados foram expressos em termos de absorbância normalizada, calculada pela equação:

$$Abs_{Normalizada} = \frac{A - A_0}{A_0} \quad (6)$$

Onde A é o valor das absorbâncias a diferentes concentrações de tensoativo e A_0 é o valor da absorbância na concentração de tensoativo igual a zero. O valor do percentual do tensoativo é definido como o número de moles do tensoativo $C_{12}E_5$ dividido pelo total da soma do número de moles de tensoativo e de lipídios que foi plotado contra a absorbância normalizada.

3.3.7) Análise Qualitativa das Proteínas Encapsuladas

A análise qualitativa das proteínas encapsuladas ou ligadas à superfície dos lipossomas foram feitas por eletroforese SDS-PAGE. Inicialmente as proteínas foram desnaturadas com o tensoativo SDS e posteriormente eluídas em gel poliacrilamida, com objetivo de determinar a capacidade dos lipossomas para a incorporação das proteínas da mistura 1 (1,36 mg/mL) com razão molar 40:20:40 de (Cit C:Mio:BSA), que obteve o melhor perfil de encapsulamento.e representava a faixa de pesos moleculares de proteínas pertencentes a extratos alergênicos.

A revelação das proteínas no gel foi feita por fixação em solução de glutaraldeído, seguida de reação com nitrato de prata e descoloramento com ácido acético. Os marcadores padrões utilizados estão apresentados na Tabela 3, com os seus respectivos pesos moleculares.

Para as amostras com proteínas encapsuladas os lipossomas foram submetidos à ação de tensoativo Triton X-100 para desestruturação das vesículas e liberação das proteínas para análise.

Tabela 3 - Proteínas - padrão usadas como marcadores de peso molecular na eletroforese.

Proteínas-Padrão	Peso Molecular (kDa)
Fosfolipase	94
Albumina Bovina	64
Ovalbumina	43
Anidrase Carbônica	30
Inibidor de Tripsina de Soja	20,1
α -Lactalbumina	14,4

3.3.8) Associação das Proteínas em Mistura à Superfície dos Lipossomas

As proteínas foram associadas à superfície dos lipossomas através de ligação covalente aos grupos amina do fosfolipídio DMPE, usado na proporção de 20% na composição das vesículas. Foi usada a mistura de proteínas de proporção molar 40:20:40 e concentração de hidratação total de 1,36 mg/mL. Periodato de sódio foi usado como agente de ligação.

Procedimento Experimental

Preparou-se periodato de sódio 0,06 mM e solução tampão de citrato a 50 mM a pH 6,0. O processo de ativação das proteínas foi feito misturando-se 5,0 mL da mistura de proteínas em 5,0 mL de periodato, e incubando à temperatura ambiente sob agitação com o recipiente completamente tampado (no escuro) por 30 minutos. Na sequência foram adicionados 5,0 mL de solução de etileno glicol nas mesmas condições do caso anterior, totalizando 15,0 mL de volume final voltando a incubar por 1 hora. As proteínas ativadas foram separadas dos reagentes não ligados em coluna Econo-Pac 10D6 - Bio-Rad de acordo com as seguintes etapas: Primeiramente passou-se 20,0 mL de tampão citrato 50,0 mM para equilibrar e lavar a coluna. Depois desse preparo inicial adicionou-se 3,0 mL da amostra preparada e descartando-se os três primeiros mL's e coletando os 4,0 mL restantes.

Na continuidade do processo a coluna foi lavada antes da adição da amostra, até a aplicação do volume total.

Depois de ativada as proteínas, foram adicionadas a 5,0 mL de suspensão de lipossomas previamente preparados pelos procedimentos descritos anteriormente. Adicionou-se 280 μ L de borohidrato de sódio, ajustou-se o pH a 9,5, incubando durante 24 horas à temperatura ambiente, para a ligação covalente das proteínas à superfície dos lipossomas. Após esse tempo, a solução foi colocada em célula de ultrafiltração para separação das proteínas que não foram ligadas.

As proteínas ligadas foram quantificadas por diferença entre a quantidade inicial e a não ligada. A análise qualitativa das proteínas ligadas na superfície das vesículas foi feita por eletroforese SDS-PAGE. O procedimento para esta análise foi descrito em 3.3.7.

*Capítulo IV – Resultados e Discussão***4.0) Resultados e Discussão**

Os resultados experimentais e discussão que serão apresentados nos itens subseqüentes estão estruturados da seguinte forma: na primeira parte são apresentados os coeficientes de partição das proteínas no sistema octanol-água, o rendimento na preparação dos lipossomas, os métodos de separação das proteínas não encapsuladas, e o diâmetro médio e distribuição de tamanhos das vesículas. Na segunda parte é apresentado o comportamento do encapsulamento das proteínas individuais e em misturas em lipossomas. Finalmente é apresentado os perfis de estabilidade em tensoativo não iônico C₁₂E₅ e em plasma humano, além da análise da exclusão de proteína(s) no processo de encapsulamento e o rendimento no processo de associação das proteínas em mistura à superfície dos lipossomas.

4.1) Coeficiente de Partição das Proteínas no Sistema Octanol/Água

O comportamento de partição das proteínas nas fases hidrofílica e hidrofóbica do sistema octanol/água (1-octanol/água) é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Partição das proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C no sistema octanol/água.

Proteína	Concentração na fase aquosa mg/mL	Coeficiente de Partição
BSA	0,9800	0,0200
Mioglobina	0,9997	0,0003
Citocromo C	0,9995	0,0005

Os dados obtidos mostram que a migração para a fase aquosa foi preferencial para a proteína BSA e total para a Mioglobina e Citocromo C. Esses resultados indicam que no processo de encapsulamento essas proteínas deverão se localizar preferencialmente na região mais hidrofílica da estrutura dos lipossomas que é o cerne aquoso, podendo também serem adsorvidas na superfície das vesículas.

4.2) Rendimentos na Preparação dos Lipossomas

Os rendimentos da preparação dos lipossomas com razão molar 70:30 (DSPC:Col) pelo método da hidratação do filme seco de lipídios expressos em termos de concentração de fosfolipídios foram em média 80% (devido a perdas no processo de extrusão) para os lipossomas unilamelares e 90% para os multilamelares, esses resultados estão de acordo com os estudos desenvolvidos por Lasic, 1993.

4.3) Separação dos Lipossomas das Proteínas não Encapsuladas

Foram utilizadas duas técnicas, uma delas a cromatografia de permeação (exclusão) em gel usando os géis de sephadex G-100 e sepharose CL-6B e a ultrafiltração. Realizaram-se as separações e recuperações das proteínas não encapsuladas e os resultados foram comparados. Na maioria dos trabalhos publicados na literatura as técnicas de cromatografia de permeação em gel (com vários tipos de géis) e a ultracentrifugação são muito utilizadas. Além dessas técnicas, o método da diálise também é muito utilizado, como descrito em Fogerite, G. S. e Mannino, R. J., 1985, na separação de lipossomas grandes dos agentes não encapsulados. Nesse trabalho, em questão, introduziu-se o método da ultrafiltração como alternativa para separações, que pouco são mencionados em pesquisas. Em alguns trabalhos como de Freitas, Jr., 1997, esta metodologia foi utilizada como uma das etapas do processo de separação, como auxílio para separação dos agentes não encapsulados.

4.3.1) Influência do Gel na Separação de Lipossomas Unilamelares (SUV's) da Proteína Albumina de Soro Bovino (BSA)

Os perfis de eluição para a separação de lipossomas unilamelares pequenos (SUV's) da proteína BSA não encapsulada são apresentados nas Figuras 13 e 14 para os géis sephadex G-100 e sepharose CL-6B respectivamente.

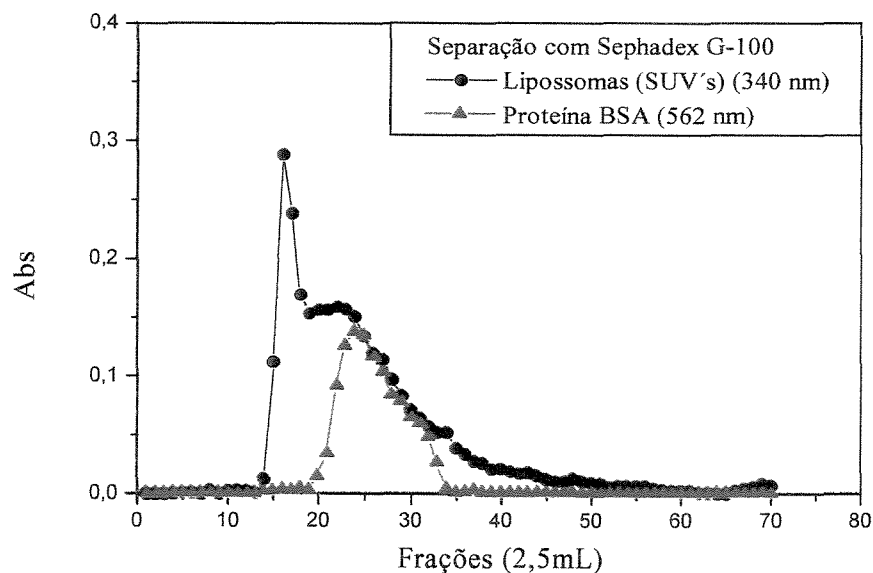


Figura 13 - Perfil de eluição para a separação da proteína BSA não encapsulada de lipossomas unilamelares (SUV's) pela técnica de cromatografia de permeação em gel (com o gel Sephadex G-100).

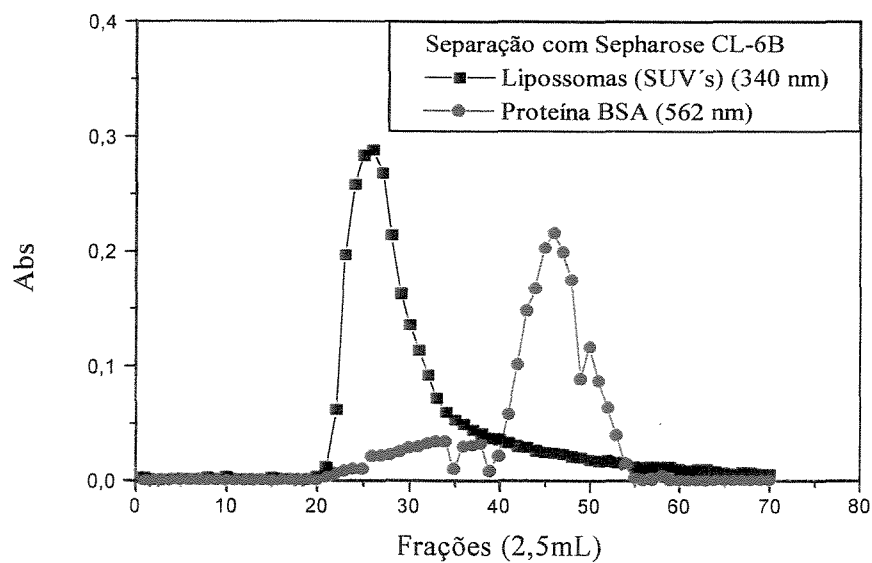


Figura 14 - Perfil de eluição para a separação da proteína BSA não encapsulada de lipossomas unilamelares (SUV's) pela técnica de cromatografia de permeação em gel (com o gel Sepharose CL-6B).

Os resultados mostraram, através da resolução dos picos referentes aos lipossomas e a proteína, que a melhor separação foi obtida com o gel sepharose CL-6B quando comparada ao gel sephadex G-100, embora ambos os géis apresentassem diâmetro de corte superior à dimensão de proteínas de peso molecular semelhante a BSA. A separação nesses géis no entanto não é total, havendo uma região significativa de sobreposição entre lipossomas e proteínas nos perfis de eluição.

Analisando a recuperação da proteína BSA não encapsulada, obteve-se em média cerca de apenas 30% nas frações de eluição quando foi utilizado o gel sepharose CL-6B e 10% de recuperação quando se utilizou o gel sephadex G-100. Por outro lado, quando foi testada a eluição da proteína Citocromo C e da Mioglobina, foi observado uma grande retenção na matrix do gel, evidenciado pela coloração dessas proteínas e pela análise das mesmas no eluído. Esses resultados foram diferentes daqueles obtidos por Freitas, Jr., 1997, que obteve bons resultados quando utilizou sepharose CL-6B na separação da BSA não encapsulada, já com o sephadex G-100 os resultados foram semelhantes a este trabalho. Outros métodos de separação são largamente utilizados, principalmente a ultracentrifugação, a qual consegue-se excelentes resultados na separação de extratos protéicos (Genin, I., e col., 1994; Davis, D., e Gregoriadis, G., 1987).

4.3.2) Comparação da Eficiência de Separação e Recuperação das Proteínas

Individuais e Misturas pelas Técnicas de Permeação em Gel e Ultrafiltração

Utilizando a técnica de ultrafiltração, como alternativa, para a separação das proteínas não encapsuladas, foram obtidos resultados bem melhores comparados à cromatografia com os géis anteriormente estudados. Com a ultrafiltração os lipossomas foram completamente retidos na membrana. Na Tabela 5 são apresentados os valores obtidos para a recuperação da proteína BSA por ambas as técnicas, cromatografia de permeação em Gel (sephadex G-100 e sepharose CL-6B), onde a melhor recuperação ocorreu com o gel sepharose CL-6B, e ultrafiltração em membrana de policarbonato.

Tabela 5 - Recuperação da Proteína BSA através das técnicas de Cromatografia de permeação em Gel (sephadex G-100 e sepharose CL-6B e Ultrafiltração em membrana de policarbonato.

Técnica	Recuperação (média)
Permeação em Gel	30%
Ultrafiltração	80%

Os resultados mostram a superioridade da técnica de ultrafiltração para a separação em questão, embora cerca de 20% das proteínas fiquem provavelmente adsorvidas na membrana da célula de separação. Na Tabela 6 são apresentados os resultados para a recuperação das proteínas não encapsuladas separadas por ultrafiltração, após o seu encapsulamento nas formas individuais e em mistura em lipossomas multilamelares. Técnicas de separação combinadas com excelentes resultados podem ser utilizadas, como no trabalho realizado por Audera, C., e col., 1991, na separação de extratos alergênicos dos lipossomas.

Tabela 6 - Recuperação das proteínas não encapsuladas individuais e em misturas após ultrafiltração.

Proteínas Individuais	% de Recuperação de Proteínas
BSA	76,6
Mioglobina	84,2
Citocromo C	81,0
Misturas de Proteínas	
Proteína inicial total (mg/mL)	
1,36	79,5
3,50	75,3

Os estudos de William, A. S. e Stewart, G. A., 1989, mostraram que a recuperação das proteínas não encapsuladas de extratos alergênicos de ácaros, quando separadas de lipossomas multilamelares não atinge valores satisfatórios (58%), já na separação dos lipossomas unilamelares e MLV's-REV a recuperação atingia 95% e 72% respectivamente,

utilizando a técnica de ultracentrifugação. Isso pode indicar uma perda de proteínas no processo de preparação. Já nesse trabalho a recuperação das proteínas tanto individuais como em misturas possuem uma recuperação na ordem de 80% quando separadas dos lipossomas multilamelares, mostrando a viabilidade da aplicação desta metodologia.

4.4) Diâmetro Médio e Distribuição de Tamanhos dos Lipossomas

4.4.1) Lipossomas Unilamelares (SUV's)

Os diâmetros médios das vesículas vazias e com a proteína BSA encapsulada em lipossomas unilamelares (SUV's) são apresentados na Tabela 7. As análises de distribuição de tamanhos e diâmetro médio foram realizadas em soluções de lipossomas previamente separadas das proteínas não encapsuladas, com suas respectivas razões molares (P/L) determinadas, sendo consideradas como razões finais.

Tabela 7 - Diâmetros médios de lipossomas unilamelares (SUV's) vazios e encapsulando a proteína BSA a várias razões molares Proteína/Lipídio final.

Lipossomas	Diâmetro Médio (nm)
Vazio	123,9
Encapsulando BSA	
(P/L) final = $8,80 \times 10^{-5}$	132,2
(P/L) final = $1,05 \times 10^{-4}$	138,5
(P/L) final = $1,14 \times 10^{-4}$	165,1
(P/L) final = $1,18 \times 10^{-4}$	165,9

Dos resultados obtidos observou-se um aumento de 6,7 a 33,3% no diâmetro médio das vesículas quando a razão molar entre a quantidade de proteínas encapsuladas e lipídios total variou de $8,8 \times 10^{-5}$ a $1,18 \times 10^{-4}$. A distribuição de tamanhos dessas vesículas foi bem estreita com uma polidispersividade que variava de 0,073 à 0,166. Os relatórios correspondentes à determinação desses parâmetros através da técnica de “Espalhamento Quase Elástico de Luz” são apresentados no apêndice 4. Os resultados obtidos estão de

acordo com aqueles apresentados por Freitas, Jr., 1997, havendo pouca alteração na diferença do raio e distribuição de tamanhos das vesículas vazias e com a proteína BSA encapsulada. Estas alterações podem ser devidas às interações hidrofílicas com a superfície das vesículas e as próprias interações Proteína-Proteína.

4.4.2) Lipossomas Multilamelares (MLV's)

Os lipossomas multilamelares vazios apresentaram diâmetros médios variando de 139,3 a 4452,0, com a maior frequência 7,6%, em 628,6 nm. A distribuição de tamanhos não variou significativamente com a razão Proteína/Lipídio final, com as faixas de diâmetros apresentadas na Tabela 8 para as diferentes proteínas encapsuladas.

Tabela 8 - Faixas de diâmetros das vesículas multilamelares encapsulando as proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C.

Proteína Encapsulada	Faixa de Diâmetro das Vesículas (nm)
BSA	250 a 7000
Mioglobina	200 a 5700
Citocromo C	238 a 6000

Os resultados obtidos, mostram uma grande variação nos tamanhos das vesículas encapsulando as proteínas BSA, Mio e Cit C com baixa frequência na distribuição dos tamanhos, neste caso não há possibilidade de termos um diâmetro médio devido a essa heterogeneidade das soluções, essa observação foi mencionada nos estudos de Lasic, 1993 e Gregoriadis, 1988. No apêndice 4 são apresentados os relatórios típicos das medidas da distribuição de tamanhos das vesículas multilamelares.

4.5) Encapsulamento de Proteínas Individuais e em Misturas

Os resultados da incorporação das proteínas individuais e em misturas de diferentes composições nas vesículas fosfolipídicas foram analisados através dos perfis que relacionam as razões (P/L) inicial e final observando as curvas de saturação, e a eficiência

de encapsulamento apresentados nas Figuras 15 a 21 e Tabelas 9 (a e b) a 11. A medida da razão $(P/L)_{\text{inicial}}$ foi realizada antes do processo de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas e a razão $(P/L)_{\text{final}}$ foi medida após esses processos.

4.5.1) Perfis de Encapsulamento da Albumina de Soro Bovino (BSA) em Lipossomas Unilamelares (SUV's) e Multilamelares (MLV's)

Na Figura 15 é apresentado o comportamento do encapsulamento da proteína BSA em lipossomas unilamelares e multilamelares. Os lipossomas foram preparados com razão molar de 70:30 (DSPC:Col). Essa razão foi utilizada como um valor intermediário dos resultados obtidos por Freitas, Jr., 1997 que comparou a estabilidade em tensoativo $C_{12}E_5$ de duas formulações com razões molares de 60:40 e 80:20 (DSPC:Col) respectivamente, sendo a primeira razão a que obteve melhor estabilidade no tensoativo. Resultados semelhantes foram observados quando se utilizou a formulação com razão molar de 70:30 (DSPC:Col) neste trabalho (não mostrado).

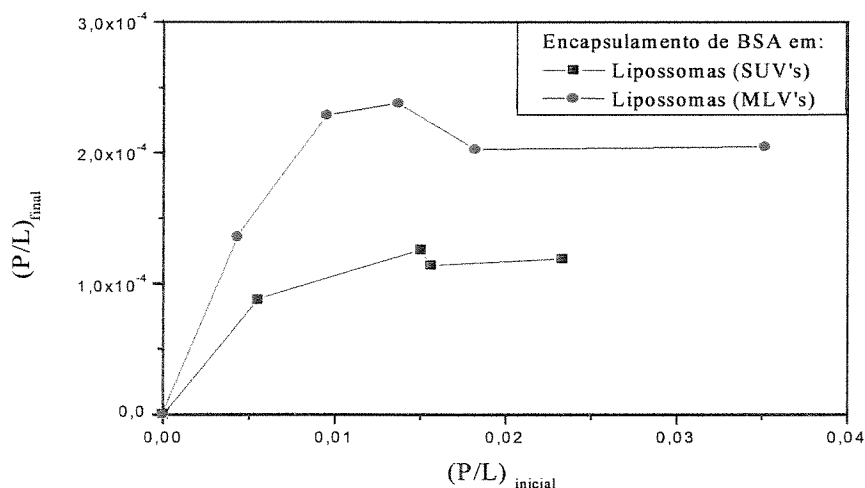


Figura 15 - Perfis de encapsulamento da proteína BSA em lipossomas unilamelares (SUV's) e multilamelares (MLV's) de razão molar 70:30 de DSPC:Col. As razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ são referentes as razões (P/L) medidas antes e após os processos de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas.

Os perfis mostram que o encapsulamento depende das razões $(P/L)_{\text{inicial}}$. Para ambos os tipos de lipossomas, a ordem de grandeza da razão $(P/L)_{\text{final}}$ foi sempre 100 vezes menor que a razão $(P/L)_{\text{inicial}}$. A saturação na região de maior encapsulamento apresentou-se aproximadamente a partir da razão $(P/L)_{\text{inicial}} 1,50 \cdot 10^{-2}$ correspondendo à razão $(P/L)_{\text{final}}$ da ordem de $1 \cdot 10^{-4}$ para os lipossomas unilamelares e $(P/L)_{\text{inicial}} 9,56 \cdot 10^{-3}$ correspondendo à razão $(P/L)_{\text{final}} 2,28 \cdot 10^{-4}$ para os multilamelares. Na Figura 16 são apresentados os perfis de eficiência de encapsulamento para as várias razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ em lipossomas unilamelares e multilamelares. Os resultados mostram que em ambos os casos a eficiência de encapsulamento decresce com o aumento da razão $(P/L)_{\text{inicial}}$. Nas regiões de máximo encapsulamento as eficiências foram 1,60% e 3,13% para as soluções de lipossomas unilamelares com razão $(P/L)_{\text{inicial}} 5,48 \cdot 10^{-3}$ e multilamelares com razão $(P/L)_{\text{inicial}} 4,32 \cdot 10^{-3}$ respectivamente.

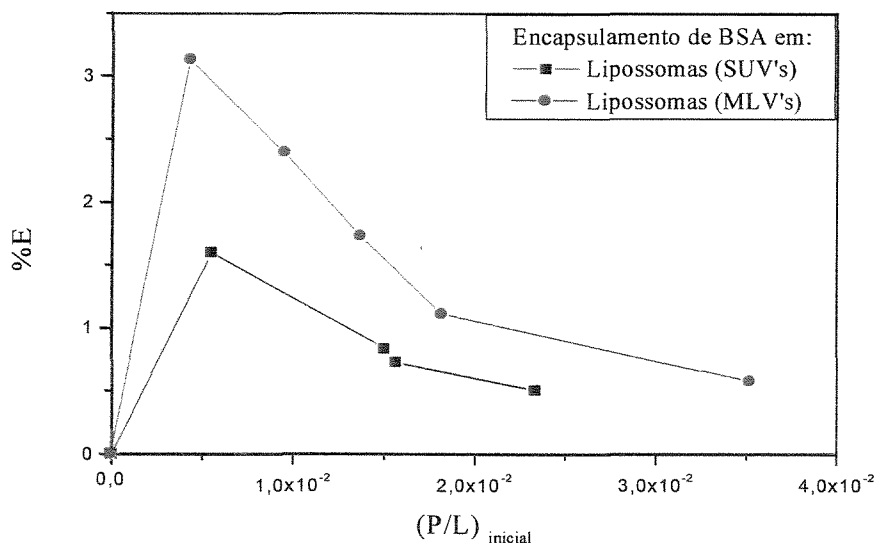


Figura 16 – Perfis de eficiências de encapsulamento da proteína BSA em lipossomas unilamelares (SUV's) e multilamelares (MLV's) de razão molar 70:30 de DSPC:Col. As razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ são referentes as razões (P/L) medidas antes e após os processos de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas.

Esses resultados mostram que para a proteína BSA, o tamanho e lamelaridade dos lipossomas influenciam na quantidade final da proteína encapsulada. Nas tabelas 9a e 9b são apresentados os valores numéricos das razões (P/L) inicial e final, bem como os valores das eficiências de encapsulamento para lipossomas unilamelares e multilamelares respectivamente, usados na construção das Figuras 15 e 16. Comparando com resultados obtidos por Shahum, E. e Thérien, M., 1988, observou-se que as melhores eficiências de encapsulamento ocorreram com razão em torno de 105 μg de BSA/ μmol de Fosfolípidios para lipossomas unilamelares. Já neste trabalho, os melhores resultados ocorreram com as razões (P/L)_{final} de 5,9 μg de BSA/ μmol de Fosfolípidio ((P/L)_{final} $8,8 \cdot 10^{-5}$) e 9,0 μg de BSA/ μmol de Fosfolípidio ((P/L)_{final} $1,35 \cdot 10^{-4}$) para lipossomas unilamelares e multilamelares respectivamente, não estando de acordo com Shahum, E. e Thérien, M., 1988, que obtiveram melhor capacidade de encapsulamento, encapsulando a mesma proteína, isso pode ser devido à composição dos lipossomas com outros fosfolípidios (DMPC e DPPE), outra solução tampão, entre outros compostos usados no meio de hidratação. Em outra pesquisa desenvolvida por Thérien, H., M., e col., 1991, observou-se que com o aumento das concentrações de hidratação das soluções de BSA, menores eficiências de encapsulamento eram obtidas, como observado neste trabalho.

Tabela 9a - Razões molares, (P/L)_{inicial} e (P/L)_{final}, e percentagens de encapsulamento para lipossomas unilamelares (SUV's) com composição molar 70:30 (DSPC:Col) encapsulando a proteína BSA à concentrações iniciais da solução de hidratação de 2,0 a 8,0 mg/mL.

Lipossomas (SUV's) encapsulando:	Razão (P/L) _{inicial}	Razão (P/L) _{final}	%E
BSA (2,0 mg/mL)	$5,48 \cdot 10^{-3}$	$8,8 \cdot 10^{-5}$	1,60
BSA (4,0 mg/mL)	$1,50 \cdot 10^{-2}$	$1,26 \cdot 10^{-4}$	0,76
BSA (6,0 mg/mL)	$1,56 \cdot 10^{-2}$	$1,14 \cdot 10^{-4}$	0,67
BSA (8,0 mg/mL)	$2,33 \cdot 10^{-2}$	$1,19 \cdot 10^{-4}$	0,47

Tabela 9b - Razões molares, $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ e percentagens de encapsulamento para lipossomas multilamelares (MLV's) com composição molar 70:30 (DSPC:Col) encapsulando a proteína BSA à concentrações iniciais da solução de hidratação de 2,0 a 16,0 mg/mL.

Lipossomas MLV's encapsulando:	Razão $(P/L)_{\text{inicial}}$	Razão $(P/L)_{\text{final}}$	%E
BSA (2,0 mg/mL)	$4,32 \cdot 10^{-3}$	$1,35 \cdot 10^{-4}$	3,13
BSA (4,0 mg/mL)	$9,58 \cdot 10^{-3}$	$2,28 \cdot 10^{-4}$	2,39
BSA (6,0 mg/mL)	$1,37 \cdot 10^{-2}$	$2,37 \cdot 10^{-4}$	1,73
BSA (8,0 mg/mL)	$1,82 \cdot 10^{-2}$	$2,02 \cdot 10^{-4}$	1,11
BSA (16,0 mg/mL)	$3,52 \cdot 10^{-2}$	$2,04 \cdot 10^{-4}$	0,58

4.5.2) Influência do Peso Molecular no Encapsulamento Individual de Proteínas em Lipossomas Multilamelares (MLV's)

Os perfis de encapsulamento para as proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C, encapsuladas individualmente são mostrados nas Figuras 17 e 18 e seguem os dados numéricos descritos na Tabela 10.

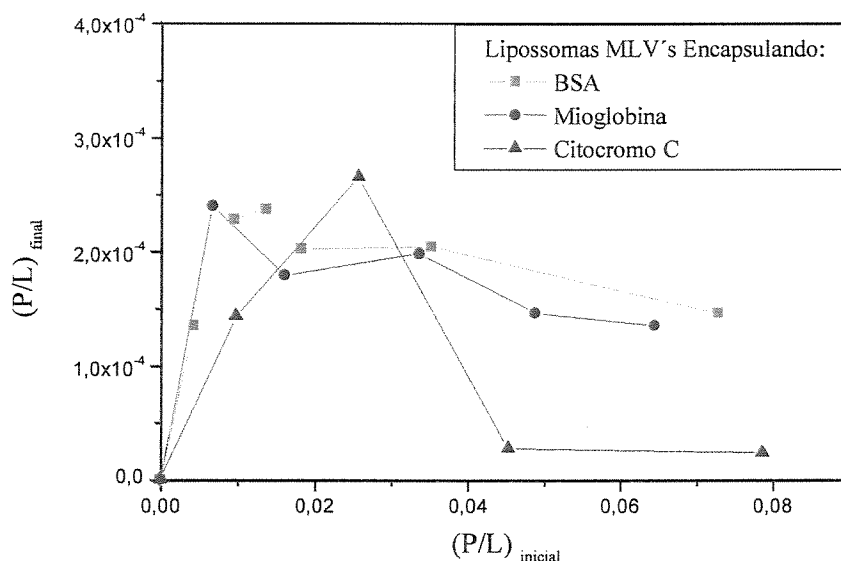


Figura 17 - Perfis de encapsulamento das proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C encapsuladas individualmente a várias razões (P/L) inicial e final em lipossomas multilamelares (MLV's) de razão molar 70:30 (DSPC:Col). As razões (P/L)_{inicial} e (P/L)_{final} são referentes as razões (P/L) medidas antes e após os processos de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas.

Os resultados mostram que em todos os casos a capacidade máxima de encapsulamento foi obtida em baixas razões (P/L)_{inicial}, para todas as proteínas, decrescendo a maiores razões. Os resultados estão de acordo com o trabalho desenvolvido por Thérien, H., M., e col., 1991. Maiores concentrações de proteínas parecem saturar as camadas externas dificultando a acomodação das mesmas nas lamelas fosfolipídicas e resultando no decréscimo da capacidade de encapsulamento para as mesmas em condições de hidratação do filme seco de lipídios. Esse efeito é mais acentuado para o Citocromo C,

que com o aumento das razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ os valores das razões $(P/L)_{\text{final}}$ são muito sensíveis e decrescem rapidamente, quando comparado com as outras proteínas estudadas. O comportamento dos perfis da Figura 18 indica que a capacidade de encapsulamento não é determinada pelo tamanho ou peso molecular das proteínas, mas pelas suas interações com a matrix fosfolipídica no processo, já que os perfis apresentaram valores de $(P/L)_{\text{final}}$ bem próximos na máxima região de encapsulamento. Os perfis foram aproximadamente iguais para as proteínas BSA e Mioglobina, e diferentes quando comparados à proteína Citocromo C, apesar da diferença de pesos moleculares ser grande entre o BSA e as outras duas proteínas estudadas. Os perfis de eficiência de encapsulamento são apresentados na Figura 18. Esses resultados confirmam a maior importância das interações Proteína-Lipídio em relação ao peso molecular ou tamanho no processo de hidratação do filme seco de lipídios.

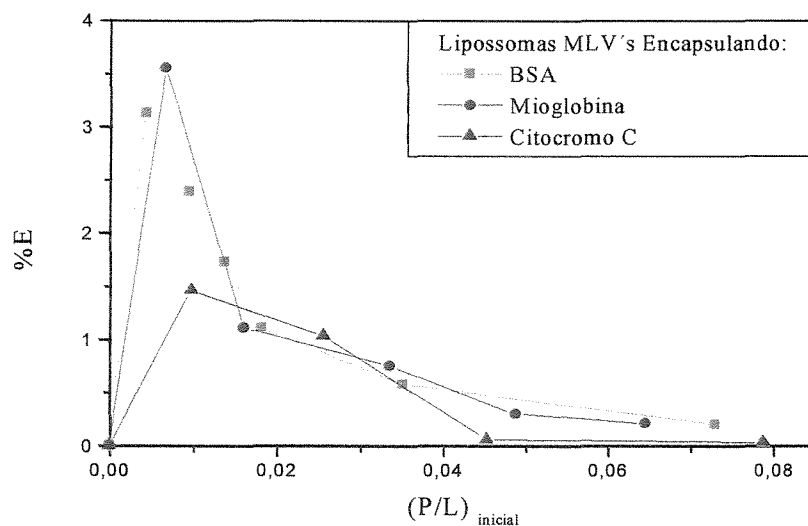


Figura 18 – Perfis de eficiências de encapsulamento de lipossomas multilamelares com razão molar 70:30 (DSPC:Col) encapsulando as proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C individualmente a várias razões (P/L) inicial. As proteínas BSA e Mioglobina possuem perfis semelhantes.

Na tabela 10 são apresentados os valores numéricos das razões (P/L) inicial e final e as eficiências de encapsulamento utilizados na construção das Figuras 15 e 16.

Tabela 10 - Razões (P/L) inicial e final, e percentagens de encapsulamento, referentes às proteínas BSA, Mioglobina e Citocromo C encapsuladas em MLV's.

Proteínas	Razão (P/L) _{inicial}	Razão (P/L) _{final}	%E
Concentrações Soluções de hidratação (mg/mL)			
Albumina de Soro Bovino			
2,0	$4,32 \cdot 10^{-3}$	$1,35 \cdot 10^{-4}$	3,13
4,0	$9,56 \cdot 10^{-3}$	$2,28 \cdot 10^{-4}$	2,39
6,0	$1,37 \cdot 10^{-2}$	$2,37 \cdot 10^{-4}$	1,73
8,0	$1,82 \cdot 10^{-2}$	$2,02 \cdot 10^{-4}$	1,11
16,0	$3,52 \cdot 10^{-2}$	$2,04 \cdot 10^{-4}$	0,58
32,0	$7,28 \cdot 10^{-2}$	$1,46 \cdot 10^{-4}$	0,20
Mioglobina			
0,8	$6,75 \cdot 10^{-3}$	$2,40 \cdot 10^{-4}$	3,55
2,0	$1,61 \cdot 10^{-2}$	$1,79 \cdot 10^{-4}$	1,11
4,0	$3,36 \cdot 10^{-2}$	$1,91 \cdot 10^{-4}$	0,56
6,0	$4,88 \cdot 10^{-2}$	$1,46 \cdot 10^{-4}$	0,30
8,0	$6,45 \cdot 10^{-2}$	$1,35 \cdot 10^{-4}$	0,21
Citocromo C			
0,8	$9,82 \cdot 10^{-3}$	$1,43 \cdot 10^{-4}$	1,46
2,0	$2,57 \cdot 10^{-2}$	$2,65 \cdot 10^{-4}$	1,03
4,0	$4,53 \cdot 10^{-2}$	$2,72 \cdot 10^{-5}$	0,06
6,0	$7,87 \cdot 10^{-2}$	$2,36 \cdot 10^{-5}$	0,03

4.5.3) Encapsulamento de Misturas de Proteínas em Lipossomas Multilamelares (MLV's)

Na Figura 19 é apresentado o comportamento do encapsulamento de misturas de proteínas de diferentes composições em lipossomas multilamelares. Foram preparadas três misturas com razões molares de 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 de Cit C:Mio:BSA respectivamente, sendo que para cada dois conjuntos dessas três proporções foram totalizados nas concentrações totais de proteínas, sendo uma delas com concentração de 1,36 mg/mL (mistura tipo 1) e a outra com 3,50 mg/mL (mistura tipo 2). Esses valores foram baseados na faixa de razão molar inicial Proteína total/Lipídio de maior capacidade de encapsulamento das proteínas individuais que obtiveram as melhores eficiências de encapsulamento (os melhores resultados ficavam em torno de 2,0 mg/mL relativo à concentração total de proteínas). Os valores numéricos obtidos e usados na construção da Figura 19 são apresentados na Tabela 11.

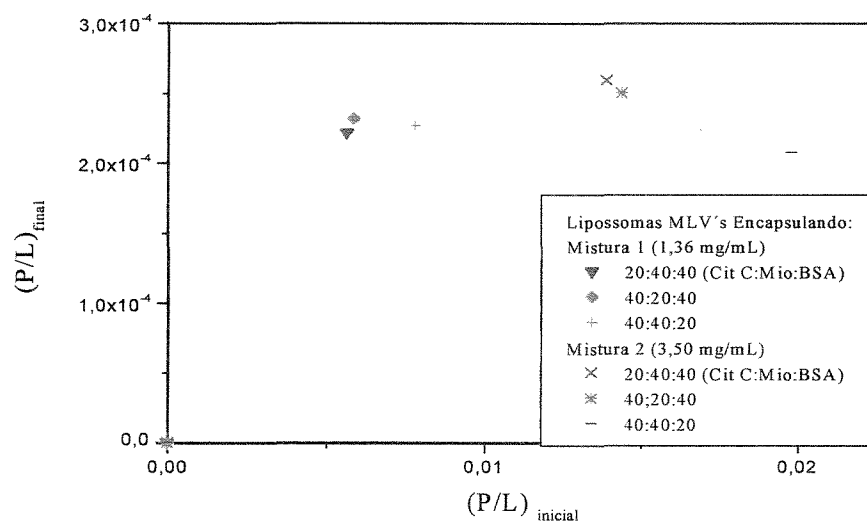


Figura 19 - Perfil de encapsulamento das proteínas em misturas 1 e 2 de composições molares (20:40:40), (40:20:40) e (40:40:20) Cit C:Mio:BSA respectivamente, em função das razões Proteína/Lipídio inicial. As razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ são referentes as razões (P/L) medidas antes e após os processos de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas.

Os dados obtidos mostram que para as razões $(P/L)_{\text{final}}$, tiveram valores bem próximos para todas as composições de cada mistura, podendo-se considerar um valor médio de $(P/L)_{\text{final}}$ de $2,26 \cdot 10^{-4}$ para mistura tipo 1 (mistura 1) e $2,39 \cdot 10^{-4}$ para a mistura tipo 2 (mistura 2). Os perfis apresentados na Figura 20 mostram que a eficiência de encapsulamento também é independente da composição individual das proteínas na mistura, apresentando decréscimos significativos com o aumento da razão $(P/L)_{\text{inicial}}$ da mistura.

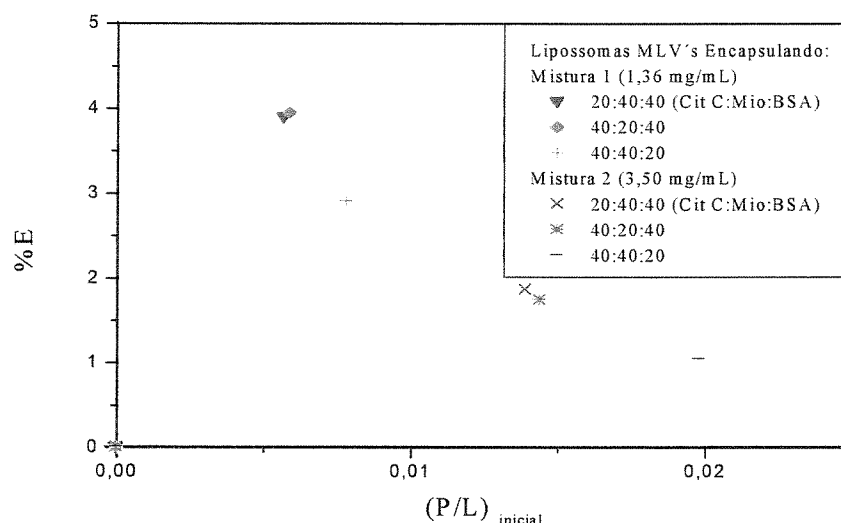


Figura 20 - Perfil de eficiências de encapsulamento das proteínas em misturas 1 e 2 de composições molares 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 de Cit C:Mio:BSA respectivamente, em função das razões Proteína/Lipídio inicial.

Comparando os resultados das misturas de proteínas utilizadas neste trabalho com os resultados obtidos por Freitas Jr., 1997, para extratos de ácaros com proteínas na mesma faixa de peso molecular, observou-se que houve semelhança na tendência da variação das eficiências de encapsulamento com as razões $(P/L)_{\text{inicial}}$, porém a quantidades de proteínas encapsuladas neste trabalho são maiores que as obtidas no encapsulamento do extrato bruto de ácaros. Neste trabalho, a mistura 1 com razões $(P/L)_{\text{inicial}} = 5,67 \cdot 10^{-3}$ (0.202 mg/mM), $5,87 \cdot 10^{-3}$, (0.201 mg/mM) e $7,81 \cdot 10^{-3}$ (0.197 mg/mM), apresentou eficiências de

encapsulamento de 3,89 , 3,94 e 2,90 respectivamente. A mistura 2 com razões $(P/L)_{\text{inicial}} = 1,39 \cdot 10^{-2}$ (0,495 mg/mM), $1,44 \cdot 10^{-2}$ (0,493 mg/mM) e $1,98 \cdot 10^{-2}$ (0,500 mg/mM) apresentou eficiências de encapsulamento de 1,86 , 1,74 , 1,04 respectivamente, e no caso do encapsulamento do extrato bruto de ácaros, de Freitas, Jr, as razões $(P/L)_{\text{inicial}} = 0,490$, 0,445 , 0,324 e 0,210 mg/mM forneceram eficiências de encapsulamento de 0,60 , 0,78 , 0,80 e 1,1 respectivamente, mesmo tratando-se de proteínas com faixa de tamanhos semelhantes (6-96 kDa). Essas diferenças devem-se provavelmente à complexidade do extrato bruto de ácaros, e as diferentes interações das proteínas com os lipídios. Na Tabela 7 são apresentados os valores numéricos que foram usados na construção das Figuras 19 e 20. Genin, I., e col., 1994, obtiveram eficiências de encapsulamento em torno de 30% ou 2/3 dos alergenios totais, podendo chegar a 50% com as proteínas associadas superficialmente às vesículas, que dependiam do tipo de lipossomas e o modo de tratamento dos extratos alergênicos (acidificação ou não). Audera, C., e col., 1991, utilizando o fosfolipídio DPPC (DPPC:Col de 60:40), na preparação de lipossomas unilamelares, obtiveram uma eficiência de encapsulamento em torno de 5,0%, próximos aos desse trabalho. Estes autores observaram que o aumento da quantidade de colesterol, contribuía para altas eficiências de encapsulamento. Os resultados obtidos por William, A., S., e Stewart, G., A, 1989, para o encapsulamento de alergenios de ácaros em lipossomas SUV's, MLV's e MLV's-REV obtiveram altas eficiências de encapsulamento (36,0%, 29,0% e 14,0%) respectivamente, e comparando com os resultados obtidos neste trabalho com os lipossomas MLV's observou-se uma grande diferença na capacidade de encapsulamento das misturas (3,58% em média) contra os 29% obtidos por McWilliam, A. S., e Stewart, G. A.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Tabela 11 - Razões (P/L) inicial e final e as percentagens de encapsulamento das misturas de proteínas com BSA, Mioglobina e Citocromo C. As soluções de hidratação possuem concentrações totais de: tipo (1) 1,36 mg/mL e tipo (2) 3,50 mg/mL respectivamente.

Mistura Tipo	Proteínas	Proporção (%)	(P/L) _{in}	(P/L) _{fin}	%Enc
1 (1,36 mg/mL)					
	Citocromo C	20	$5,67 \cdot 10^{-3}$	$2,21 \cdot 10^{-4}$	3,89
	Mioglobina	40			
	BSA	40			
	Citocromo C	40	$5,87 \cdot 10^{-3}$	$2,31 \cdot 10^{-4}$	3,94
	Mioglobina	20			
	BSA	40			
	Citocromo C	40	$7,81 \cdot 10^{-3}$	$2,26 \cdot 10^{-4}$	2,90
	Mioglobina	40			
	BSA	20			
2 (3,50 mg/mL)	Citocromo C	20	$1,39 \cdot 10^{-2}$	$2,59 \cdot 10^{-4}$	1,86
	Mioglobina	40			
	BSA	40			
	Citocromo C	40	$1,44 \cdot 10^{-2}$	$2,50 \cdot 10^{-4}$	1,74
	Mioglobina	20			
	BSA	40			
	Citocromo C	40	$1,98 \cdot 10^{-2}$	$2,07 \cdot 10^{-4}$	1,04
	Mioglobina	40			
	BSA	20			

4.5.4) Comparação entre o Encapsulamento das Proteínas Individuais e Misturas em Lipossomas Multilamelares (MLV's)

Uma comparação entre a capacidade de encapsulamento das proteínas individuais e em misturas nas composições molares (20:40:40), (40:20:40) e (40:40:20) Cit C:Mio:BSA respectivamente é apresentada nas Figuras 21 e 22. Esses resultados mostram que aparentemente a capacidade de encapsulamento das misturas é determinada pelos perfis das proteínas individuais BSA e Mioglobina. O tamanho ou peso molecular parece não influenciar na capacidade dos lipossomas para o encapsulamento das proteínas em mistura, prevalecendo as interações das proteínas com os lipídios na estrutura multilamelar das vesículas.

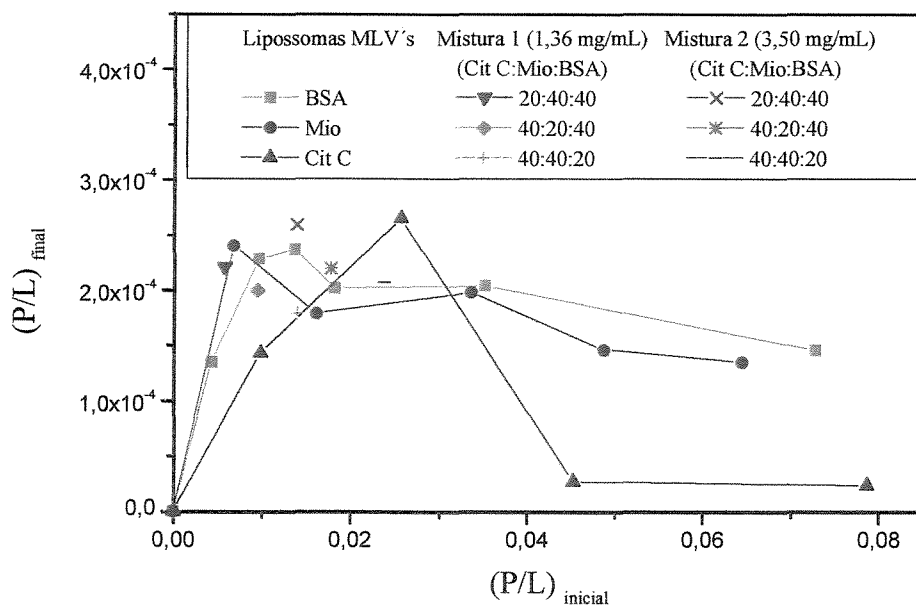


Figura 21 - Comparação entre os perfis de encapsulamento das proteínas individuais e em mistura (1 e 2) com proporções molares: (20:40:40), (40:20:40) e (40:40:20) Cit C:Mio:BSA respectivamente, em função da razões Proteína/Lipídio inicial. As razões $(P/L)_{\text{inicial}}$ e $(P/L)_{\text{final}}$ são referentes as razões (P/L) medidas antes e após os processos de encapsulamento e separação das proteínas não encapsuladas dos lipossomas.

Na Figura 22 é apresentada uma comparação entre as eficiências de encapsulamento das proteínas individuais e em misturas, com as mesmas composições molares já mencionadas. Da mesma maneira, há uma tendência para que a eficiência de encapsulamento das misturas seja determinada pelos perfis individuais de BSA e Mioglobina, para todas as razões Proteína/Lipídio inicial. Em todos os casos as proteínas BSA e Mioglobina apresentaram perfis semelhantes nas formas individuais e em mistura, enquanto que o perfil de eficiência de encapsulamento do Citocromo C apresentou valores bem menores que os anteriores.

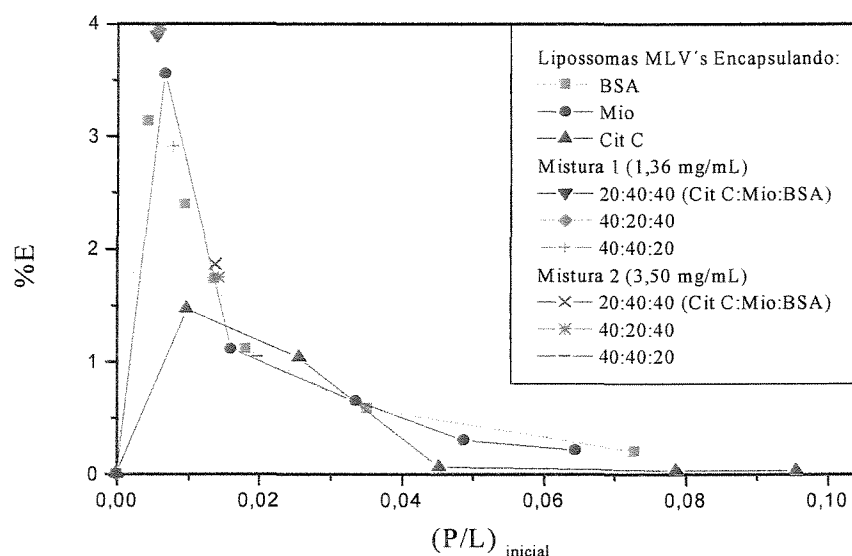


Figura 22 - Comparação entre os perfis de eficiências de encapsulamento das proteínas individuais e em mistura (1 e 2) com proporções molares: 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 de Cit C:Mio:BSA respectivamente, em função das razões Proteína/Lipídio inicial.

4.6) Estabilidade de Lipossomas Encapsulando Proteínas Individuais e Misturas de Proteínas em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$ e em Plasma Humano

Foram realizados vários testes de estabilidade com várias formulações de lipossomas em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ (Polioxietileno 5 Lauril Éter) e em plasma humano. Os perfis de estabilidade são apresentados nas Figuras 23 a 29. As absorbâncias foram normalizadas de acordo com o item 3.3.6 pela equação 6.

4.6.1) Estabilidade de Lipossomas Encapsulando Proteínas Individuais em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$

As Figuras 23 a 25 mostram os perfis de estabilidade de lipossomas encapsulando proteínas individualmente.

4.6.1.1) Estabilidade de Lipossomas Unilamelares (SUV's) e Multilamelares (MLV's) Encapsulando Albumina de Soro Bovino (BSA) em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$

Na Figura 23 são apresentados os perfis de estabilidade da Albumina de Soro Bovino (BSA) encapsulada em lipossomas unilamelares (SUV's) e multilamelares (MLV's).

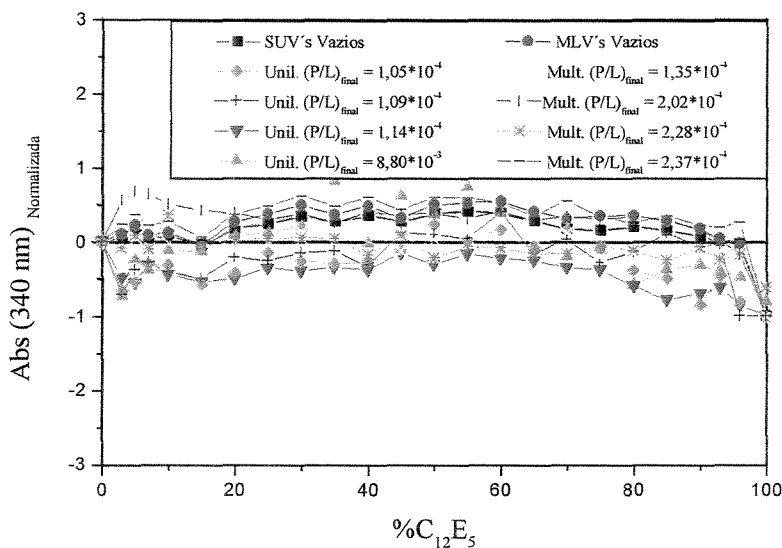


Figura 23 - Estabilidade de lipossomas unilamelares (SUV's) e multilamelares (MLV's) encapsulando a proteína BSA em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ em função das razões (P/L) final.

Verificou-se que os perfis são semelhantes para ambos os tipos de lipossomas (unilamelares ou multilamelares) encapsulando a proteína BSA e não apresentaram nenhuma tendência definida de variação do comportamento com as variações das razões

(P/L) final das vesículas. Em todos os casos, houve pequena variação positiva ou negativa das absorbâncias das soluções, observou-se que para as vesículas unilamelares as variações negativas tinham predominância e para os lipossomas multilamelares apresentaram desvios positivos, indicando alterações de tamanhos das vesículas em presença de concentrações crescentes de tensoativo. Esses resultados indicam que os lipossomas preparados são susceptíveis à penetração de moléculas anfifílicas pequenas, tais como as de $C_{12}E_5$, em sua bicamada fosfolipídica mesmo a baixas concentrações do tensoativo.

4.6.1.2) Estabilidade de Lipossomas Multilamelares (MLV's) Encapsulando

Mioglobina (Mio) em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$

A Figura 24 apresenta os perfis de estabilidade de lipossomas com várias formulações encapsulando a proteína Mioglobina.

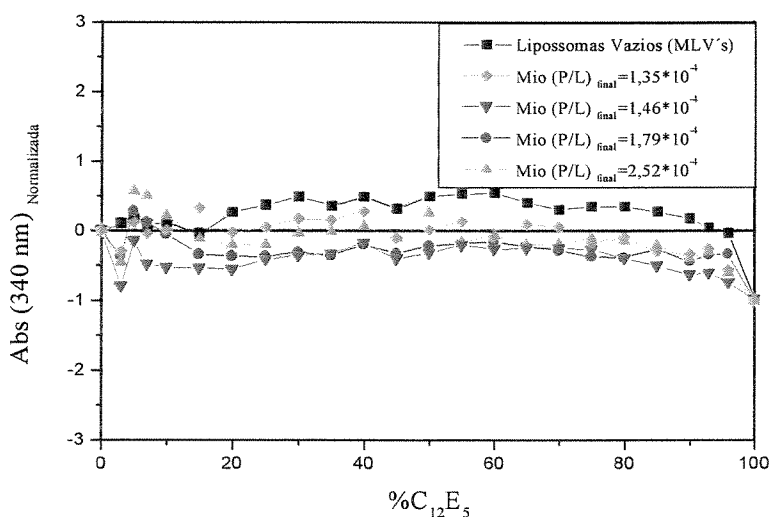


Figura 24 - Estabilidade de lipossomas multilamelares (MLV's) encapsulando a proteína Mioglobina em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ em função das razões (P/L) final.

Nesse caso, observou-se variações positivas das absorbâncias para os lipossomas vazios, enquanto que houve uma tendência para variações negativas das absorbâncias para

as vesículas contendo proteínas. Nessas últimas situações, aparentemente houve uma tendência inicial de redução de tamanhos das vesículas, a baixa concentração de tensoativo, característica da troca de lipídios entre vesículas e micelas do tensoativo, seguida do aumento da absorbância (crescimento das vesículas) entre 20 e 60% de tensoativo aproximadamente, e posterior redução, em consequência da desestabilização das bicamadas fosfolipídicas das vesículas e formação de micelas.

4.6.1.3) Estabilidade de Lipossomas Multilamelares (MLV's) Encapsulando Citocromo C (Cit C) em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$

Na Figura 25 são apresentados os perfis de estabilidade de lipossomas multilamelares encapsulando a proteína Citocromo C.

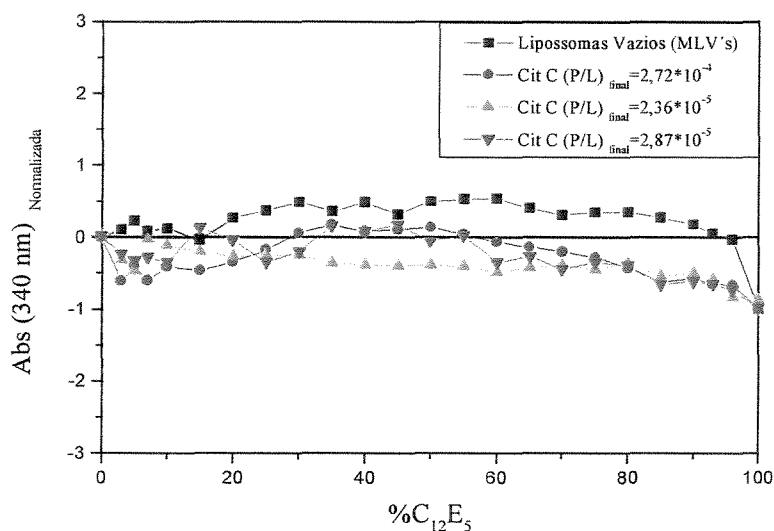


Figura 25 - Estabilidade de lipossomas multilamelares encapsulando a proteína Citocromo C em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$ em função das razões (P/L) final. Foram analisados três amostras com razões $(P/L)_{final}$ de $2,72 \cdot 10^{-5}$, $2,36 \cdot 10^{-4}$ e $2,87 \cdot 10^{-4}$ respectivamente.

Os perfis de estabilidade dos lipossomas contendo Citocromo C, mostrados na Figura 25, apresentam comportamento semelhante àqueles contendo Mioglobina, em relação aos vazios. Para as vesículas contendo proteínas, o comportamento também foi semelhante, com um decréscimo inicial sofrido pelas absorbâncias, seguido de aumento na faixa entre 20 e 60% de tensoativo, e depois a queda característica da formação de micelas.

4.6.1.4) Estabilidade de Lipossomas Multilamelares (MLV's) Encapsulando Misturas de Proteínas em Tensoativo não Iônico $C_{12}E_5$

Nas Figuras 26 e 27 são apresentados os perfis de estabilidade de lipossomas multilamelares encapsulando as misturas de proteínas (tipos 1 e 2) respectivamente. Foram utilizadas as misturas com proporções molares de: 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 referentes à Cit C:Mio: BSA.

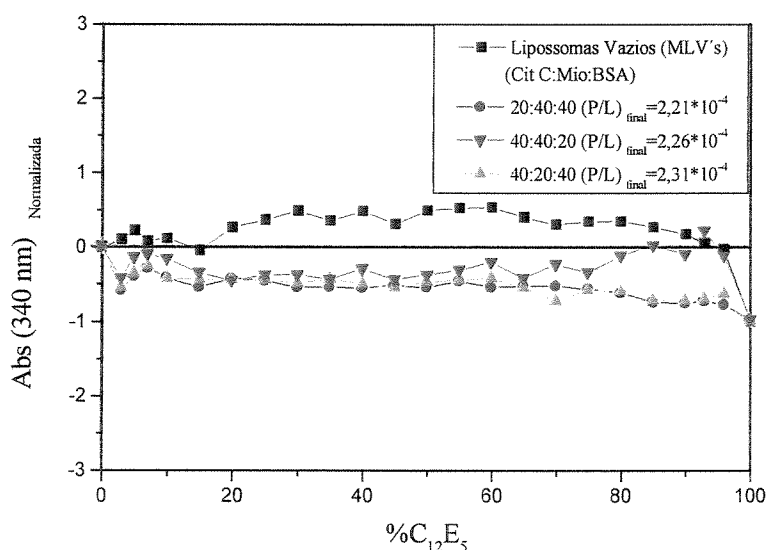


Figura 26 - Estabilidade de lipossomas multilamelares encapsulando misturas de proteínas (tipo 1) (concentração total da solução de hidratação de 1,36 mg/mL) em tensoativo não iônico $C_{12}E_5$. Foram utilizadas as misturas com proporções molares de: 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 referentes à Cit C:Mio: BSA.

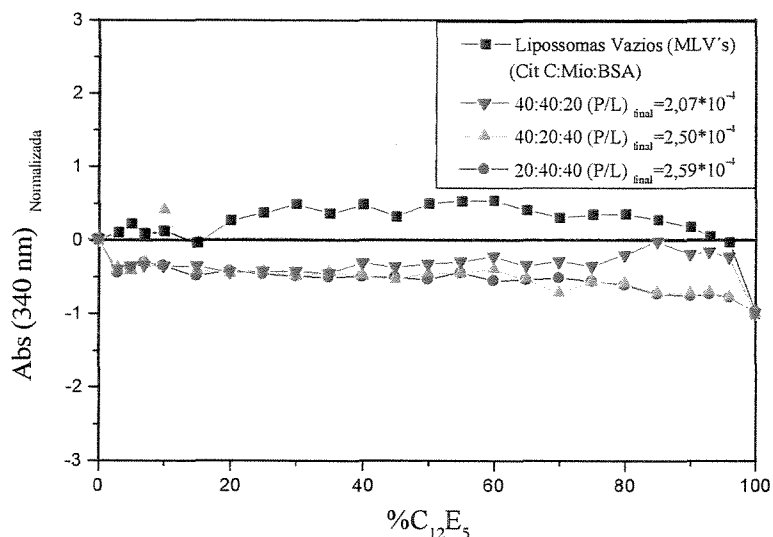


Figura 27 - Estabilidade de lipossomas multilamelares encapsulando misturas de proteínas (tipo 2) (concentração total da solução de hidratação de 3,50 mg/mL) em tensoativo não iônico C₁₂E₅. Foram utilizadas as misturas com proporções molares de: 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 referentes à Cit C:Mio: BSA.

Os perfis de estabilidade apresentados nas Figuras 26 e 27 mostram que de uma forma geral em todas as formulações utilizadas com as razões molares de proteínas 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 (Cit C:Mio:BSA) respectivamente, as soluções sofreram inicialmente um decréscimo de cerca de 50% do valor inicial, porém mantiveram-se estáveis até a concentração de tensoativo de aproximadamente 60%. A partir desta concentração houve indicação de crescimento das vesículas antes da desagregação em micelas para a mistura com menor proporção de BSA. Nas misturas com outras proporções a fase de crescimento não é observada. Em todas as proporções, observou-se que as estruturas são menos sensíveis à variações da concentração do tensoativo, do que os lipossomas vazios, isso pode ser devido às interações das proteínas com a superfície da bicamada fosfolipídica, além de outras interações possíveis entre as próprias proteínas evitando a penetração das moléculas de tensoativo na bicamada promovendo a sua desestruturação e conseqüente destruição das vesículas.

4.6.2) Estabilidade de Lipossomas Multilamelares (MLV's) Encapsulando Misturas de Proteínas em Plasma Humano

Na Figura 28 é apresentado o perfil de estabilidade de lipossomas MLV's encapsulando a mistura (tipo 1) em plasma humano, como feito com o tensoativo $C_{12}E_5$.

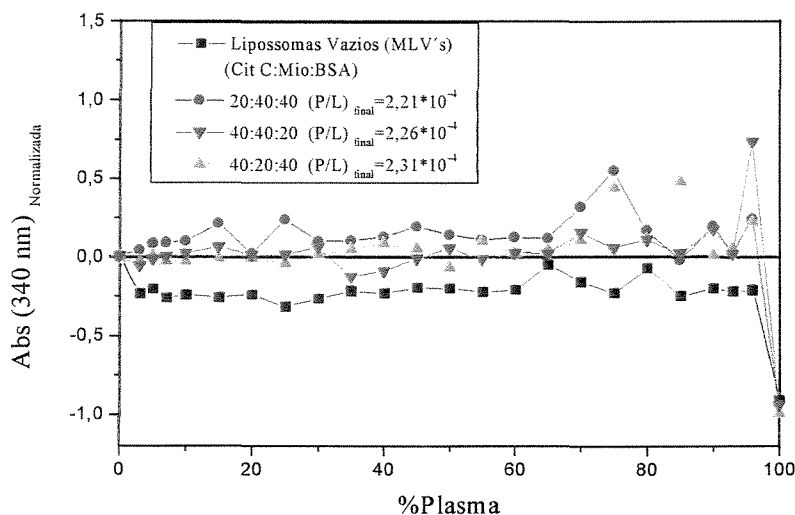


Figura 28 - Estabilidade de lipossomas multilamelares em plasma humano encapsulando misturas de proteínas (tipo 1) (concentração total da solução de hidratação de 1,36 mg/mL). Foram utilizadas as misturas com proporções molares de: 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 referentes à (Cit C:Mio: BSA).

Os resultados experimentais da Figura 28 mostram que a exposição do plasma humano por 2 horas, não produziu variação significativa na estabilidade dos lipossomas em toda a faixa de concentração de plasma nas soluções. Esses resultados podem ser observados tanto para vesículas vazias quanto contendo as proteínas em misturas de várias composições. Os resultados referentes à mistura 2 são praticamente idênticos (não apresentados) a esses resultados.

Na Figura 29 é apresentado o perfil de estabilidade de lipossomas MLV's encapsulando a mistura (tipo 1) em plasma humano a várias concentrações (10, 30 e 100%).

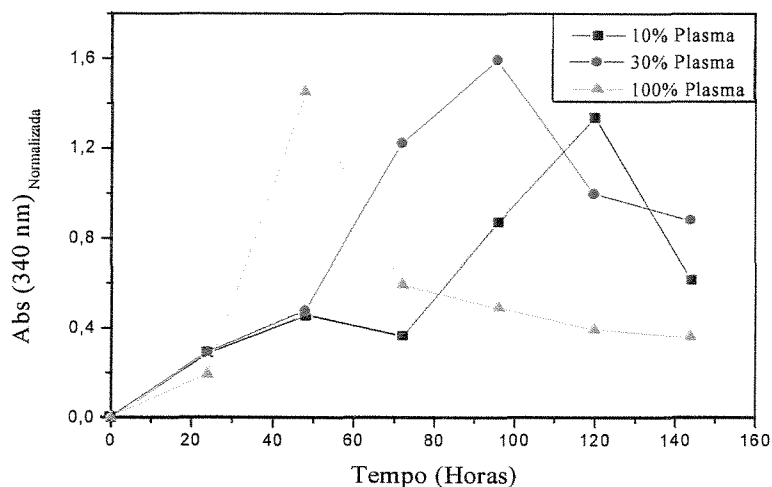


Figura 29 - Estabilidade de lipossomas multilamelares encapsulando a mistura de proteínas (tipo 1) com proporção 40:20:40, e $(P/L)_{\text{final}} 2,31 \cdot 10^{-4}$, em plasma humano durante 6 dias consecutivos. O ensaio foi realizado na temperatura média de 33 °C. O plasma foi diluído em tampão HEPES 10mM e pH 7,4.

Nesta análise procurou-se verificar o tempo de estabilidade das vesículas de lipossomas (provenientes da mistura (tipo 1), com proporção molar 40:20:40 que obteve a melhor capacidade de encapsulamento e $(P/L)_{\text{final}}$ de $2,31 \cdot 10^{-4}$) por 6 dias. Os resultados mostram que a estabilidade diminui com o tempo à medida que aumenta-se a concentração de plasma. Com o plasma totalmente puro (100%), observa-se que o crescimento e a agregação das vesículas começou a ocorrer com 20 horas de incubação, prolongando-se até 40 horas, havendo após esse período a completa desestruturação das vesículas. Para aplicações clínicas intravenosas, os lipossomas devem permanecer estáveis por mais de 20 dias (segundo Gregoriadis, 1988). Embora essas vesículas não tenham atingido esse nível de estabilidade, resultados promissores poderiam ser obtidos em aplicações intradérmicas ou subcutânea, onde as concentrações de proteínas do plasma são significativamente menores que no sangue.

4.7) Análise Qualitativa das Proteínas Encapsuladas a partir de suas Misturas

A análise qualitativa das proteínas encapsuladas a partir de suas misturas foi feita através da eletroforese de amostras dos lipossomas previamente rompidos com o detergente Triton X-100. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 30 para as misturas com composições molares de 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 referentes à Cit C:Mio:BSA respectivamente.

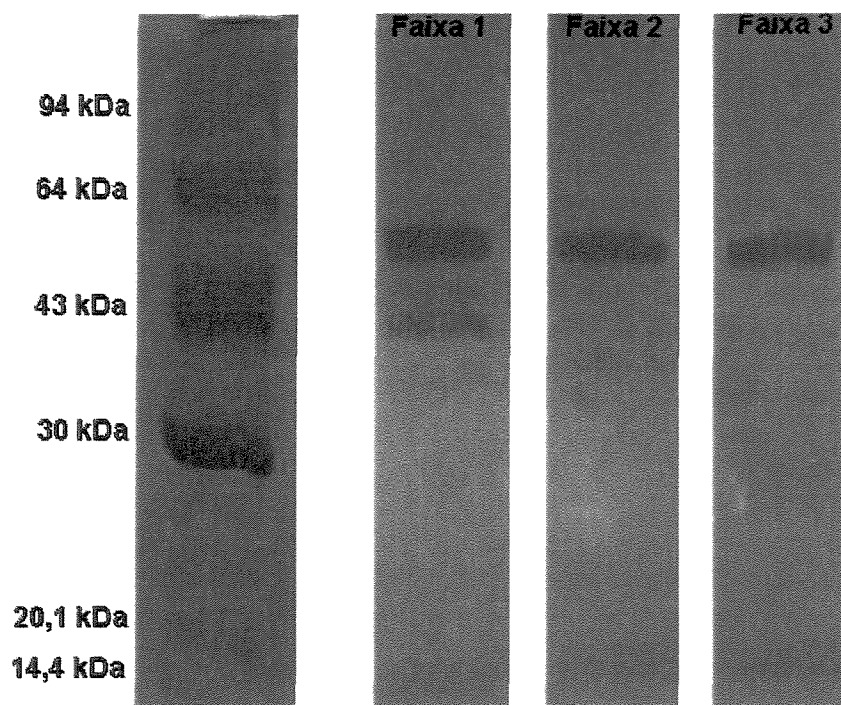


Figura 30 - Eletroforese SDS-PAGE das misturas de proteínas que foram encapsuladas em lipossomas multilamelares após rompimento com Triton X-100. As faixas 1, 2 e 3 representam as misturas de proteínas com composições molares de 20:40:40, 40:20:40 e 40:40:20 referentes à Cit C:Mio: BSA respectivamente.

Observa-se na Figura 30 a presença nítida de bandas na região de peso molecular entre 66,7 e 43 kDa dos marcadores, indicando a possível presença da proteína BSA que pode ter sido desmembrada nas amostras analisadas, devido a presença de Triton X-100 na faixa de menores pesos moleculares aparecem bandas bem claras, indicativas da possibilidade da presença da proteína Citocromo C em muito menor proporção. Não há bandas perceptíveis na região de peso molecular da Mioglobina (18,8 kDa), podendo

indicar a sua exclusão, ou sua presença em concentrações muito baixas nas amostras. Para todas as misturas observa-se a predominância da proteína BSA, a de maior peso molecular, em relação à Mioglobina e Citocromo C.

Esses resultados indicam que na incorporação de proteínas na faixa de peso molecular de 12 a 66,7 kDa, característica dos extratos alergênicos brutos, pode haver a predominância de proteínas de maior peso molecular em lipossomas multilamelares, após o encapsulamento pelo método da hidratação do filme seco de lipídios. Segundo os resultados de McWilliam e Stewart, 1989, os MLV's incorporaram todas as proteínas pertencentes a faixa alergênica (de ácaros) com pesos moleculares de 14,0 a 67,0 kDa, entretanto no encapsulamento de MLV's-REV e SUV's observou-se a exclusão de proteínas com pesos moleculares de 16,0; 36,0 e 43,0 kDa. Esses resultados demonstraram que as interações Proteína-Lipídio constituem o fator determinante do encapsulamento e exclusão de proteínas. A capacidade dos lipossomas para o encapsulamento de misturas depende muito mais da composição das proteínas constituintes do que da faixa de pesos moleculares.

4.8) Associação das Proteínas em Mistura à Superfície dos Lipossomas

A associação das proteínas em mistura à superfície dos lipossomas foi feita com a mistura 1 na proporção molar de 40:20:40 referentes à Cit C:Mio:BSA, através do método do periodato, descrito nos itens 3.3.7 e 3.3.8. O rendimento total do processo foi 2,26% em relação à proteína total. A análise das proteínas foram feitas pelo método Hartree. No trabalho desenvolvido por Shahum, E., e Thérien, H., M., 1988, conseguiu-se um rendimento de 80% da proteína BSA utilizada. Os autores Davis, D., e Gregoriadis, G., 1987 utilizando a proteína toxóide do tétano obtiveram um rendimento médio em torno de 63%. Os resultados desse trabalho mostram que pouca quantidade de proteína foi ligada covalentemente à superfície das vesículas em comparação aos outros trabalhos citados anteriormente, que pode ser devido à composição dos lipossomas com outros fosfolipídios. A análise qualitativa das proteínas associadas proveniente da mistura 1 são apresentadas na Figura 31 que representa a eletroforese realizada com os lipossomas contendo proteínas

ligadas covalentemente à sua superfície. Observa-se a presença de apenas uma banda fraca, entre os pesos moleculares 43 e 64 kDa que provavelmente representa a proteína BSA. Não há indícios da presença de Mioglobina e Citocromo C na amostra analisada. Esse resultado indica que na associação covalente de proteínas em mistura à superfície de lipossomas multilamelares, usando periodato, pode haver predominância da proteína BSA em relação à Mioglobina e Citocromo C. A diluição da amostra, decorrente das várias etapas de separação durante a reação e a interferência do periodato, não permite concluir se houve exclusão das proteínas de baixo peso molecular.

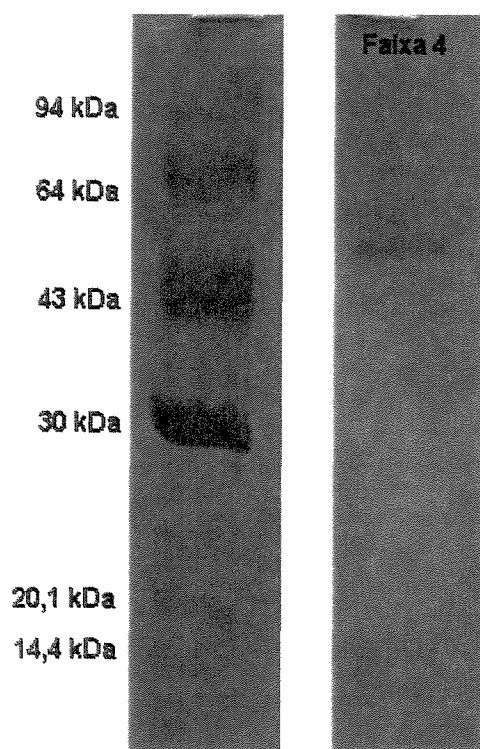


Figura 31 – Eletroforese SDS-PAGE da amostra de lipossomas multilamelares com a superfície modificada com mistura de proteínas (concentração de hidratação total de 1,36 mg/mL) com proporções molares de 40:20:40 referentes à de Cit C:Mio:BSA.

Capítulo V – Conclusões e Sugestões

5.0) Conclusões e Sugestões

Neste capítulo, alguns comentários são feitos juntamente com as conclusões gerais sobre os resultados obtidos neste trabalho, e a partir destas algumas sugestões são apresentadas para futuras pesquisas.

5.1) Conclusões

Com os resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Proteínas individuais na faixa de pesos moleculares 12,3 a 66,7 kDa, característica de extratos alergênicos brutos, podem ser incorporadas em lipossomas multilamelares compostos do lipídio distearoilfosfatidilcolina (DSPC) e colesterol (Col) na razão molar 70:30 (DSPC:Col), pelo método da hidratação do filme seco de lipídios.
- A quantidade total de proteínas individuais encapsulada nos lipossomas multilamelares, expressa em termos de razão Proteína/Lipídio, (P/L), é sempre 100 vezes menor que a razão (P/L) usada na solução inicial, na faixa de $4,32 \cdot 10^{-3}$ a $9,82 \cdot 10^{-3}$ Proteína/Lipídio, independente do peso molecular da proteína. O encapsulamento é muito mais dependente das interações Proteína-Lipídio que do peso molecular das proteínas.
- O encapsulamento das proteínas em misturas apresentou comportamento semelhante ao das proteínas individuais, com predominância da proteína BSA em relação à Mioglobina e Citocromo C.
- Os lipossomas vazios ou encapsulando as proteínas individuais ou em misturas apresentaram-se estáveis em presença do tensoativo $C_{12}E_5$ em toda faixa de concentração, indicando um bom empacotamento dos lipídios na estrutura dos lipossomas, o qual não sofreu alterações significativas com a presença das proteínas.

- Em presença de plasma humano, os lipossomas mantiveram-se estáveis até 20 horas de incubação. Para aplicações clínicas intravenosas, os lipossomas devem permanecer estáveis por mais de 20 dias. Embora essas vesículas não tenham atingido esse nível de estabilidade, resultados promissores poderiam ser obtidos em aplicações intradérmicas ou subcutânea, onde as concentrações de proteínas do plasma são significativamente menores que no sangue.

- Misturas de proteínas, na faixa de pesos moleculares 25,8 a 36,7 kDa podem também ser associadas à superfície dos lipossomas por ligação covalente. Nesse caso, houve também a predominância da proteína BSA em relação à Mioglobina e Citocromo C.

5.2) Sugestões

- Analisar mais profundamente a exclusão de proteína(s) no processo de encapsulamento de misturas.

- Avaliar, testar, caracterizar e comparar o encapsulamento utilizando extratos alergênicos reais em lipossomas multilamelares (MLV's) e unilamelares (SUV's).

- Administrar as formulações de lipossomas encapsulando extratos reais em experimentos "in vitro" e "in vivo", procurando analisar as respostas imunes e os caminhos de indução das respostas imunológicas, inclusive com formulações em que a superfície possa ser modificada.

- Preparar e testar lipossomas com outras formulações (proporções e tipos de fosfolipídios mais compatíveis com o sistema imune).

*Capítulo VI – Referências Bibliográficas***6.0) Referências Bibliográficas**

Allen, T. M. *Removal of Detergent and Solvent Traces from Liposomes.*

Liposomes Technology. Vol. 1 (G. Gregoriadis, edc). Boca Raton, Fla: CRC Press. p. 109-122, (1984).

Allen, T. M., e Cleland, L. G. *Serum Induced Leakage of Liposome*

Contents. Biochim. Biophys. Acta. No. 597, p. 418-426, (1980).

Allison, A. C., e Gregoriadis, G. *Liposomes as Immunological*

Adjuvants. Nature. Vol. 252, p. 252, (1974).

Alving, C. R. *Liposomes as Carriers of Antigens and Adjuvants. J. Immunol.*

Methods. No. 140, p. 1-13, (1991).

Alving, C. R. *Immunologic Aspects of Liposomes: Presentation and*

Processing of Liposomal Protein and Phospholipid Antigens. Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1113, p. 307-322, (1992).

Alving, C. R., Koulchin, V., Glenn, G. M., e Rao, M. *Liposomes as*

Carrier of Peptide Antigens: Induction of Antibodies and Cytotoxic T Lymphocytes to Conjugated and Unconjugated Peptides. Immunological Reviews. Vol. 145, p. 5-31, (1995).

Audera, C., Ramirez, J., Soler, E., e Carreira, J. *Liposomes as Carriers for*

Allergy Immunotherapy. Clinical and Experimental Allergy. Vol. 21, p. 139-144. (1991).

Barenholz, Y., e Crommelin, D. J. A. *Liposomes as Pharmaceutical dosage Forms. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology* (J. Swarbrick, ed). New York: Marcel Dekker, p. 1-39, (1994).

Black, C. D., e Gregoriadis, G. *Interaction of Liposomes with Blood Plasma Proteins. Biochem. Soc. Trans. No. 4, p. 253-256, (1976).*

Bonte, F., e Juliano, R. L. *Interaction of Liposomes with Serum Lipoproteins. Chem. Phys. Lip. No. 40, p. 359-372, (1986).*

Buiting, A., Van Rooijen, N., e Claasen, E. *Liposome as Antigen Carriers and Adjuvants in Vivo. Res. Immunol. Vol. 143, p. 471-586, (1992).*

Carter, D. C., and Ho, J. X. *Structure of Serum Albumin. Advanced in Protein Chemistry. Vol. 45, p. 153-196, (1994).*

Chen, Jr, P. S., Toribara, T. Y., e Warner, H. *Microdetermination of Phosphorus. Anal. Chem. Vol. 28, No. 11. P. 1756-1758, (1956).*

Crommelin, D. J. A. , e Schreier, H., *Collidal Drug Delivery Systems, vol. 66, p. 73-190, ed. (1994).*

Dal Monte, P., e Szoka, F. *Effect of Liposome Encapsulation on Antigen Presentation in Vitro: Comparison of Presentation by Peritoneal Macrophages and B Cell Tumours. J. Immunol. Vol.142, p. 1437-1440, (1989).*

Davis, D. e Gregoriadis, G. *Liposomes as Adjuvants with Immunopurified Tetanus Toxoid: Influence of Liposomal Characteristics*. **Immunology**. No. 61, p. 229-234, (1987).

Damen, J. e col. *Effect of Lipoprotein-Free Plasma on the Interaction of Human High Density Lipoprotein With Egg Yolk Phosphatidylcholine Liposomes*. **Biochim. Biophys. Acta**. No. 620, p.90, (1980).

Damen, J., e col. *Transfer and Exchange of Phospholipid Between Small Unilamellar Liposomes and Rat Plasma High Density Lipoproteins. Dependence on Cholesterol Content and Phospholipid Composition*. **Biochim. Biophys. Acta**. No. 665, p. 538, (1981).

Edwards, K., e Almegren, M. *Kinetics of Surfactant-Induced Leakage and Growth of Unilamellar Vesicles*. **Progress in Colloid & Polymer Science**. Vol. 82, p. 190-197, (1990).

Edwards, K., e Almegren, M. *Solubilization of Lecithin Vesicles by C₁₂E₈*. **Journal of Colloid and Interface Science**. V. 147, n. 1, p.1-21. (1991).

Edwards, K., e Almegren, M. *Surfactant-Induced and Structural Change of Lecithin Vesicles: Effect of Surfactant Headgroup Size*. **Langmuir**. V. 8, p. 824-832, (1992).

Fogerite, S. G., e Mannino, R. *Rotary Dialysis: Its Application to the Preparation of Large Liposomes and Proteoliposomes (Protein-Lipid Vesicles) with High Encapsulation Efficiency and Efficient Reconstitution of Membrane Proteins*. **Analytical Biochemistry**. V. 148, p. 15-25, (1985).

- Ford, Jr., N. C. *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy* – R. Pecora (Ed.) Plenum Press, New York. p. 7-57, (1985).
- Francis, M. J., Fry, C. M., e Rowlands, D. J. *Gen. Virol.* No. 66, p. 2347-2354, (1985).
- Freitas Jr., B. *Estudo do Encapsulamento do Extrato Protéico Bruto de Ácaro da Espécie Blomia Tropicalis em Lipossomas. Tese de Mestrado*, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, S.P., (1997).
- Frézard, F. *Liposomes: From Biophysics to the Design of Peptide Vaccines. Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* Vol. 32, p. 181-189. (1999).
- Friede, M., M. H. V., Van Regenmortel e F. Schuber. *Lyophilized Liposomes as Shelf Items for the Preparation of Immunogenic Liposome-Peptide Conjugates. Analytical Biochemistry.* No. 211, p.117-122, (1993).
- Fries, L., Gordnay, D., Richards, R., e seus colaboradores. *Liposomal Malaria Vaccine in Humans: A Safe and Potent Adjuvant Strategy. Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* No. 89, p. 358-362, (1992).
- Genin, I., Barrat, G., e col. *Optimization and Characterization of Freeze-Dried Multilamellar Liposomes Incorporating Different Standardized Allergen Extracts. Allergy.* No. 49, p. 645-652, (1994).

- Gregoriadis, G., (ed). **Liposome Technology, Vol. II, CRC Boca Raton, (1993).** Scherphof, G. L., Damen, J., and Wilschut, J. *Interaction of Liposomes with Plasma Proteins.* P. 205-224.
- Gregoriadis, G (ed.). *Liposomes as Drug Carriers.* Wiley, Winchester, (1988).
- Gregoriadis, G. *Immunological Adjuvants, A Role for Liposomes.* Immunol. Today. Vol.11, p. 89-98, (1990).
- Gregoriadis, G., e Allison, A. C., *Liposomes in Biological Systems.* New York: John Wiley., ed. (1980).
- Gregoriadis, G., Davis, D., e Davies, A. *Liposomes as Immunological Adjuvants: Antigen Incorporating Studies.* Vaccine. Vol. 5, p. 145-151, (1987).
- Hartree, E. F. *Determination of Protein: A Modification of the Lowry Method That Gives a Linear Photometric Response.* Analytical Biochemistry. No. 48, p. 422-427, (1972).
- Israelachvili, J., Marcelja, S., e Horn, R. G. *Physical Principles of Membrane Organization.* Q. Ver. Biophys. Vol. 13, p. 121-200, (1980).
- Jones, M. V., e Nicholas, A. R. *The Effect of Blood Serum on the Size and Stability of Phospholipid Liposomes.* Biochim. Biophys. Acta. No. 1065, p.145-152, (1991).

- Just, M., Berger, R., e seus colaboradores. *A Single Vaccination with an Inactivated Hepatitis A Liposome Vaccine Induces Protective Antibodies after only Two Weeks. Vaccine. Vol. 10, No. 11, p. 737-739. (1992).*
- Kirby, C., et al. *Effect of Cholesterol Content of Small Unilamellar Liposomes on their Stability In Vivo and In Vitro. Biochem. J.. No. 186, p. 591, (1980).*
- Lasic, D. D. *The Mechanism of Vesicle Formation. Biochem. J. vol. 256, p. 1-11, (1988).*
- Lasic, D. D. *Liposomes from Fisics to Aplications. Amsterdan, London, New York: Elsevier, 1993.*
- Lasic, D. D. *Novel Apliccations of Liposomes. TibTech , vol. 16, p. 307-321, Jul. 1998.*
- Lopes, L., e Chain, B. *Liposome Mediated Delivery Stimulates a Class I-Restricted Cytotoxic T Cell Response to a Soluble Antigen. Eur. J. Immunol. No. 22, p. 287-290, (1992).*
- Mahendra, K. J., e Zakim, D. *The Spontaneous Incorporation of Proteins into Preformed Bilayers. Biochim. Biophys. Acta. Vol. 906, p. 33-68, (1987).*
- Maruyama, K., Mori, A., Bhadra, S., e Huang, R. *Proteins and Peptides Bound to Long-Circulating Liposomes. Biochim. Biophys. Acta. Vol. 1070, p. 246-252, (1991).*

Mehta, R. T., Mehta, Kapil., e seus colaboradores. *Effect of Liposomal Amphotericin B on Murine Macrophages and Lymphocytes. Infection and Immunity*. Vol. 47, No. 2, Feb, p. 429-433. (1984).

Meyer, J., Whitcomb, L., e Collins, D. *Efficient Encapsulation of Proteins Within Liposomes for Slow Release In Vivo. Biochem. Biophys. Research Communications*. Vol. 199, No. 2, p. 433-438, (1994).

Moraes, Â. M. *Preparação, Caracterização e Avaliação da Citotoxicidade de Lipossomas Contendo o-Carboranilpropilamina, L-p-Boronofenilalanina e Doxorubicina. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química/Unicamp, (1996).*

Nakanish, T., Kunisawa, J., e seus colaboradores. *Positively Charged Liposome Functions as an Efficient Immunoadjuvant in Inducing Immune Responses to Soluble Proteins. Biochemical and Biophysical Research Communications*. Vol. 240, p. 793-797. (1997).

New, R. R. C., *Liposomes: A Practical Approach. Oxford: IRL Press at Oxford University Press., Ed. (1990).*

Nilsson, K.; Almgren, M.; Brown, W.; Jansson, M. *Effects of a Non-Ionic Surfactant on Small Unilamellar Lecithin Vesicles. Mol. Cryst. Liq. Cryst., v. 152, p. 181-203. (1987).*

Ostro, M. J. *Liposomes. Scientific American. Vol 256, No. 1, p. 90-99, (1987 (a)).*

Papahadjoupoulos, D., *Liposomes and their Uses in Biology and Medicine.*

Ann. N. Y. Acad. Sci. P.308., ed. (1978).

Phillips, N. c., Gagné, L., e seus colaboradores. *Influence of Phospholipid*

Composition on Antibody Responses to Liposome Encapsulated Protein and Peptide Antigens. Vaccine. Vol. 14, No. 9, p. 898-904, (1996).

Reddy, R., Zhou, F., e seus colaboradores. *pH Sensitive Liposomes Provide na*

Efficient Means of Sensitizing Target Cells to Class I Restricted CTL Recognition of a Soluble Protein. J. Immunol. Methods. No. 141, p. 157-163, (1991).

Ribas, A. M. *Estudo da Estabilidade de Bicamadas Lipídicas em Presença de*

Tensoativos – Tese de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química/Unicamp, (1997).

Richards, R., Hayne, M., Hockmeyer, W., e Alving, C. R. *Liposomes,*

Lipid A and Alum Enhance the Immune Response to a Synthetic Malaria Sporozite Antigen. Infect. Immun.. No. 56, p. 682-686, (1988).

Ruiz, J; Goñi, F. M.; Alonso, A. *Surfactant-Induced Release of Liposomes Contents.*

A survey of Methods and Results. Biochimica et Biophysica Acta. V. 937, p. 127-134. (1988).

Shahum, E. e Thérien, H. *Immunopotential of the Humoral Response by Liposomes:*

Encapsulation versus Covalent Linkage. Immunology. Vol. 65, p.315-317, (1988).

Smith, P.H. et al. *Mesurement of Protein Using Bicichoninic Acid. Anal.*

Biochemis. Vol. 150, p. 76-85, April (1985).

Stites, D. P., e Terr, A. I. **Basic Human Immunology.** (ed. Appleton and Lange). p. 7-34, (1991).

Su, D., e Van Rooijen, N. *The Role of Macrophages in the Immunoadjuvant Action of Liposomes: Effects of Elimination of Spleenic Macrophages on the Immune Response Against Intra-Venously Injected Liposome Associated Albumin Antigen.* **Immunology.** Vol.66, p. 466, (1989).

Szoka, F. *The Macrophage as The Principal Antigen Presenting Cell for Liposome Encapsulated Antigen.* **Res. Immunol.** Vol. 143, p. 186, (1992).

Tan, L. e Gregoriadis, G. *Effect of IL-2 on the Immunoadjuvant Activity of Liposomes.* **Biochemical Society Transactions.** Vol. 17, p. 693-694, (1988).

Thérien, H., Shahum, E., e Fortin, A. *Liposome Adjuvanticity: Influence of Dose and Protein:Lipid Ratio on the Humoral Response to Encapsulated and Surface-Linked Antigen.* **Cell. Immunol.** No. 136, p. 402-413, (1991).

Van Rooijen, N. *The liposome mediated macrophage suicide technique.* **J. Immunol. Methods.** No. 124, p. 1, (1989).

Vannier, W.E. e Snyder S. L. *Antibody Response to Liposome Associated Antigen.* **Immunol. Lett.** No. 19, p. 59-64, (1988).

Warren, H. S. e Chedid, L.A. *Future Prospects for Vaccine Candidates.* **CRC Crit. Rev. Immunol.** No. 8, p. 83-101, (1988).

William, A S., e Stewart, G. A. *Production of Multilamellar, Small Unilamellar and Reverse-Phase Liposomes Containing House Dust Mite Allergens. Potential Adjuvants in the Immunotherapy of Allergic Disease.* **Journal of Immunological Methods.** Vol. 121, p. 53-60. (1989).

Xiao, Q., Gregoriadis, G. e Ferguson, M. *Immunoadjuvant Action of Liposomes for Entrapped Poliovirus Peptide.* **Biochemical Society Transactions.** Vol. 17, p. 695-697, (1988).

Apêndice 1

Curva de Calibração para o Ensaio Fosfato.

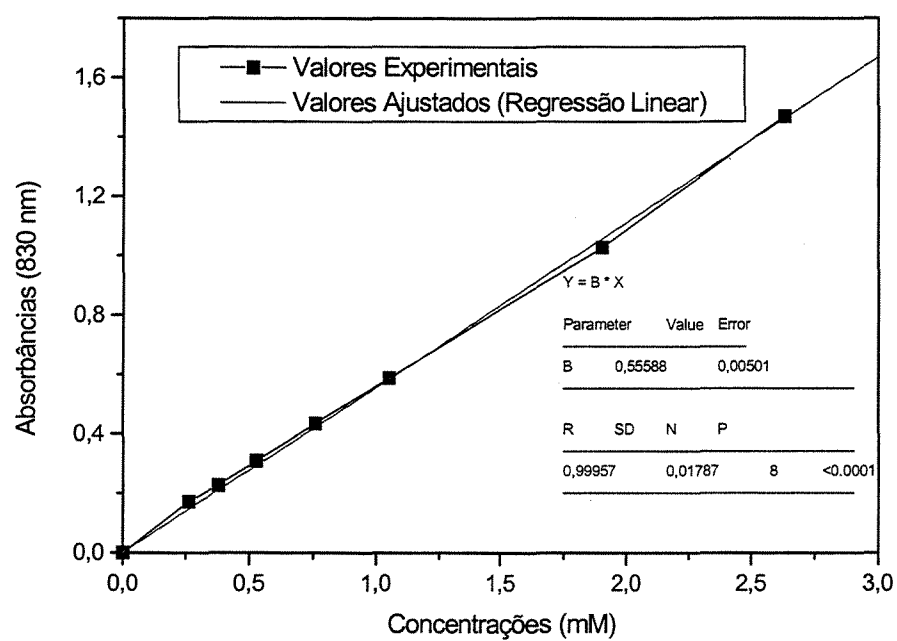


Figura A.1 Curva de calibração para o ensaio fosfato.

Apêndice 2

Curvas de Calibração para Determinação do Teor de Proteínas

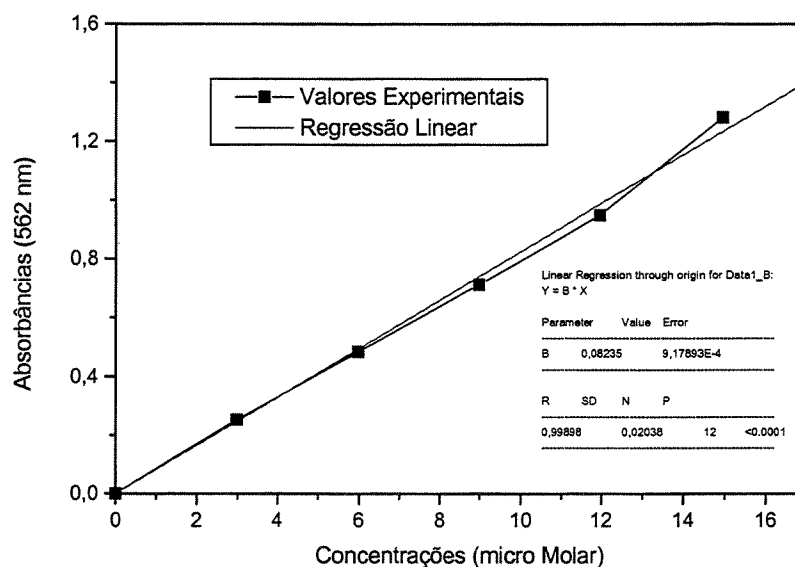


Figura A.2.a Curva de calibração, da proteína BSA, com o Ácido Bicincônico.

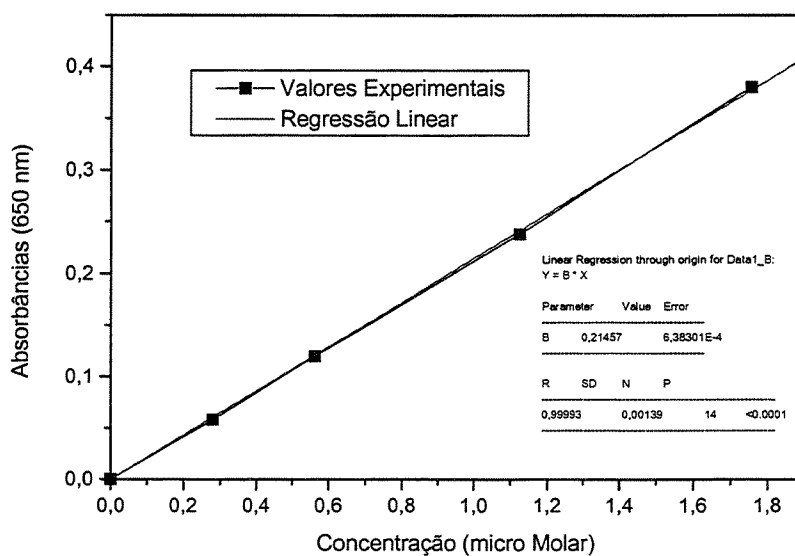


Figura A.2.b Curva de calibração da proteína BSA (Método de Lowry-Modificado).

Curvas de Calibração para Determinação do Teor de Proteínas

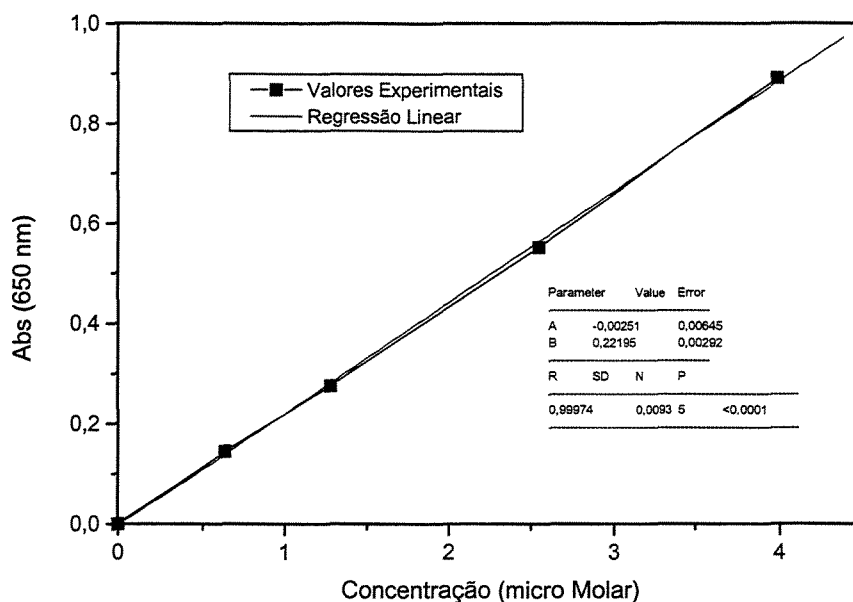


Figura A.2c - Curva de calibração da proteína Mioglobina (Método de Lowry-Modificado)

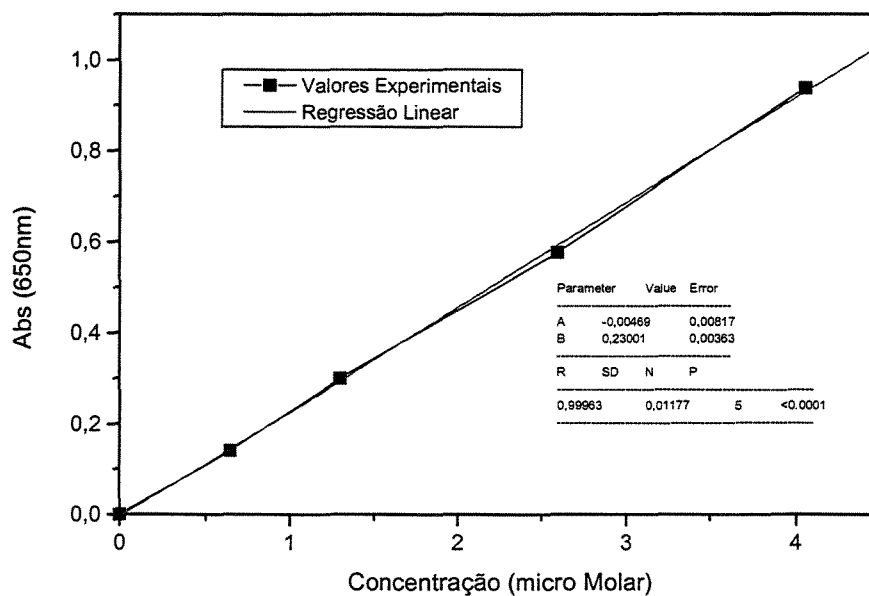


Figura A.2d – Curva de calibração da proteína Citocromo C (Método de Lowry-Modificado)

Apêndice 3

Concentrações das Soluções de Hidratação de Proteínas Utilizadas no Encapsulamento dos Lipossomas

Tabela A.3 - Dados referentes às soluções de hidratação das proteínas utilizadas no encapsulamento de lipossomas multilamelares.

Proteínas	Concentração (mg/mL)	Concentração (mM)
BSA	4,0	0,0625
	6,0	0,0937
	8,0	0,124
	16,0	0,250
	32,0	0,500
Mioglobina	0,8	0,0425
	2,0	0,106
	4,0	0,213
	6,0	0,319
	8,0	0,425
Citocromo C	0,8	0,0649
	2,0	0,162
	4,0	0,324
	6,0	0,487
	8,0	0,649

Apêndice 4

Resultados de Análises de Tamanhos dos Lipossomas

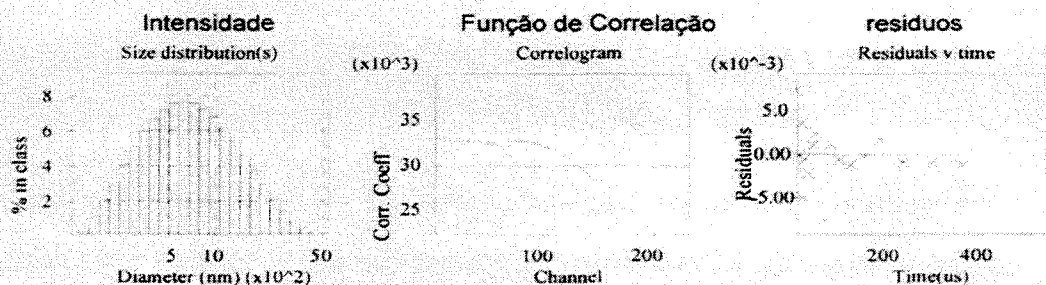
4.1) Lipossomas Multilamelares Vazios

Relatório de Análise de Tamanho de Partículas/Moléculas

Título da Amostra = Lipossomas Vazios
 Descrição da Amostra = MLV
 Operador = Igor Ricardo
 Dados Obtidos em 11/05/99 às 14:50:33

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
139.3	0.4	464.9	7.2	1551.2	4.6
162.0	1.1	540.5	7.5	1803.3	3.7
188.3	2.1	628.3	7.6	2096.5	2.9
218.9	3.1	730.5	7.5	2437.3	2.1
254.5	4.1	849.2	7.2	2833.4	1.4
295.9	5.1	987.3	6.8	3294.0	0.8
344.0	6.0	1147.7	6.1	3829.5	0.4
399.9	6.7	1334.3	5.4	4452.0	0.1



Cumulants mean (Z Ave) 787.6 Polidispersão 1.000

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633
 Temperatura = 25.0
 Ângulo = 90.0
 Equipamento = Autosizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 60
 Tipo de Análise = Contin
 Número de Pontos Ajustados = 18
 Razão de Espaçamento = 1.2
 Primeiro Ponto Utilizado = 65

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 0.890
 pH = N/A
 Índice de Refração do Dispersante = 1.331
 Índice de Refração da Amostra = 2.740
 Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 18.2
 Razão Sinal/Ruído = 10.1
 Erro do Ajuste = 0.0032
 Faixa de Análise = 100
 Pico 1: Diâmetro Médio = 871.1 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

Tempo de Amostragem (us) = 0.5
 Fator de Diluição = 2
 Milhares de Contagens/s = 29.3
 Calc. far point 25795
 Meas. far point 29834

Estes Dados Foram Obtidos No Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas
 DPB/FEQ/UNICAMP

Este Relatório foi impresso em 11/05/99 às 14:50:44

4.2) Lipossomas Multilamelares Encapsulando Citocromo C

Relatório de Análise de Tamanho de Partículas/Moléculas

Título da Amostra = Cit C (P/L) final = 0,000265

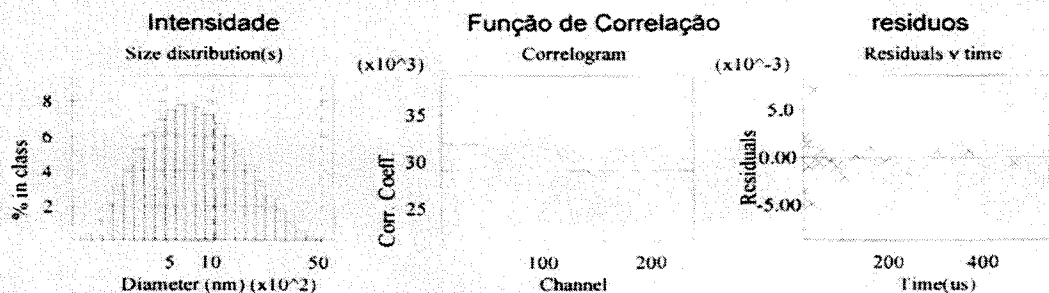
Descrição da Amostra = MLV

Operador = Igor Ricardo

Dados Obtidos em 11/05/99 às 14:54:20

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
156.9	0.4	523.4	7.4	1746.4	4.3
182.4	1.2	608.5	7.7	2030.3	3.5
212.0	2.2	707.4	7.8	2360.3	2.6
246.5	3.2	822.4	7.6	2743.9	1.8
286.6	4.3	956.1	7.3	3189.9	1.2
333.1	5.3	1111.5	6.7	3708.5	0.6
387.3	6.2	1292.2	6.0	4311.3	0.3
450.2	6.9	1502.2	5.2	5012.0	0.1



Cumulants mean (Z Ave) 886.8 Polidispersão 1.000

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633
Temperatura = 25.0
Ângulo = 90.0
Equipamento = Autosizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 60
Tipo de Análise = Contin
Número de Pontos Ajustados = 18
Razão de Espalhamento = 1.2
Primeiro Ponto Utilizado = 65

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 0.890
pH = N/A
Índice de Refração do Dispersante = 1.331
Índice de Refração da Amostra = 2.740
Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 24.3
Razão Sinal/Ruído = 10.2
Erro do Ajuste = 0.0025
Faixa de Análise = 100
Pico 1: Diâmetro Médio = 938.1 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

Tempo de Amostragem (us) = 0.5
Fator de Dilação = 2
Milhares de Contagens/s = 29.3
Calc. far point 25735
Meas. far point 29131

Estes Dados Foram Obtidos No Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas
DPB/FEQ/UNICAMP

Este Relatório foi impresso em 11/05/99 às 14:54:31

4.4) Lipossomas Multilamelares Encapsulando BSA

Relatório de Análise de Tamanho de Partículas/Moléculas

Título da Amostra = BSA (P/L) final = 0,000135

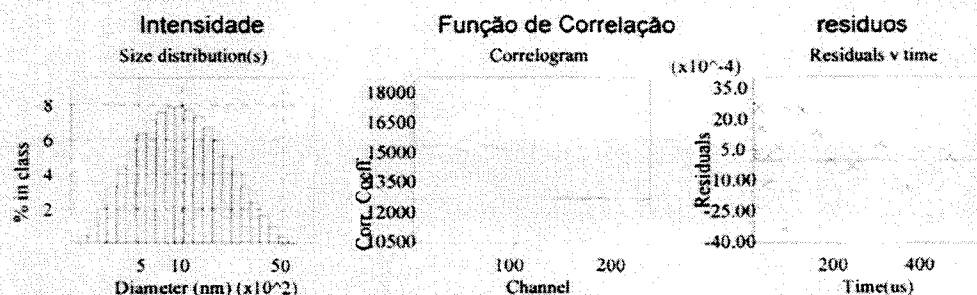
Descrição da Amostra = MLV

Operador = Igor Ricardo

Dados Obtidos em 11/05/99 às 15:20:51

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
212.4	0.5	708.5	7.6	2363.5	4.2
246.9	1.2	823.7	7.9	2747.6	3.3
287.0	2.2	957.5	7.9	3194.1	2.4
333.7	3.3	1113.2	7.7	3713.2	1.6
387.9	4.4	1294.1	7.3	4316.7	1.0
451.0	5.5	1504.4	6.7	5018.3	0.5
524.3	6.4	1748.9	6.0	5833.8	0.2
609.5	7.1	2033.1	5.1	6781.9	0.0



Cumulants mean (Z Ave) 1200.0 Polidispersão 1.000

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633
Temperatura = 25.0
Ângulo = 90.0
Equipamento = Autosizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 60
Tipo de Análise = Contin
Número de Pontos Ajustados = 18
Razão de Espaçamento = 1.2
Primeiro Ponto Utilizado = 65

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 0.890
pH = N/A
Índice de Refração do Dispersante = 1.331
Índice de Refração da Amostra = 2.740
Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 74.9
Razão Sinal/Ruído = 21.1
Erro do Ajuste = 0.0015
Faixa de Análise = 100
Pico 1: Diâmetro Médio = 1234.3 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

Tempo de Amostragem (us) = 0.5
Fator de Dilação = 2
Milhares de Contagens/s = 20.3
Calc. far point 12322
Mesa. far point 12659

Estes Dados Foram Obtidos No Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas
DPB/FEQ/UNICAMP

Este Relatório foi impresso em 11/05/99 às 15:21:07

4.3) Lipossomas Multilamelares Encapsulando Mioglobina

Relatório de Análise de Tamanho de Partículas/Moléculas

Título da Amostra = Mio (P/L) final = 0,000179

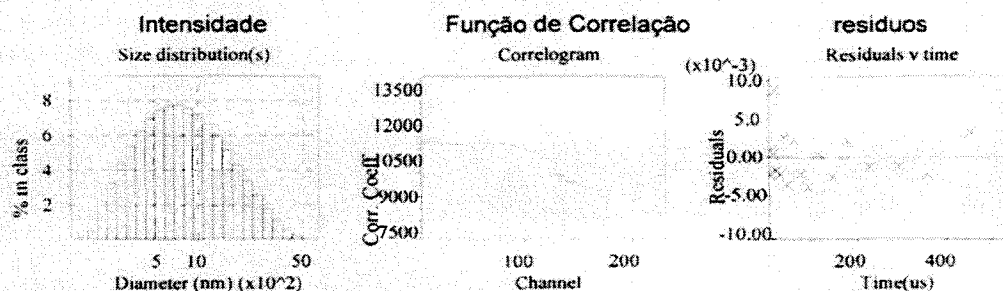
Descrição da Amostra = MLV

Operador = Igor Ricardo

Dados Obtidos em 11/05/99 às 15:14:10

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
164.7	0.5	549.6	7.4	1833.5	4.3
191.5	1.2	638.9	7.7	2131.6	3.4
222.6	2.2	742.7	7.8	2478.0	2.6
258.8	3.3	863.5	7.6	2880.8	1.8
300.9	4.4	1003.8	7.2	3349.1	1.2
349.8	5.4	1167.0	6.7	3893.5	0.6
406.6	6.3	1356.7	6.0	4526.3	0.3
472.7	7.0	1577.2	5.2	5262.1	0.1



Cumulants mean (Z Ave) 931.1 Polidispersão 1.000

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633
Temperatura = 25.0
Ângulo = 90.0
Equipamento = Autocizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 48
Tipo de Análise = Contin
Número de Pontos Ajustados = 18
Razão de Espalhamento = 1.2
Primeiro Ponto Utilizado = 65

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 0.890
pH = N/A
Índice de Refração do Dispersante = 1.331
Índice de Refração da Amostra = 2.740
Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 29.1
Razão Sinal/Ruído = 15.3
Erro do Ajuste = 0.0032
Faixa de Análise = 100
Pico 1: Diâmetro Médio = 981.7 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

Tempo de Amostragem (us) = 0.5
Fator de Dilação = 2
Milhares de Contagens/s = 18.7
Calc. far point 8355
Meas. far point 9878

Estes Dados Foram Obtidos No Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas
DPB/FEQ/UNICAMP

Este Relatório foi impresso em 11/05/99 às 15:14:23

Malvern Instruments Ltd, Malvern UK +44 1684 892456

4.5) Lipossomas Multilamelares Encapsulando Mistura 1

Relatório de Análise de Tamanho de Partículas/Moléculas

Título da Amostra = Mistura 1 40:20:40 (P/L) final = 0,000231

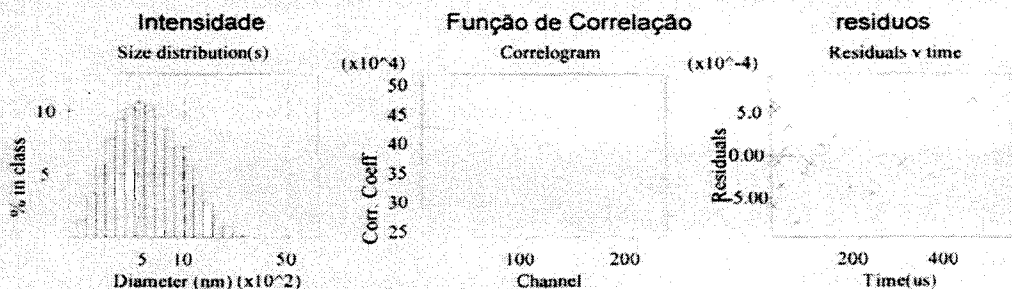
Descrição da Amostra = MLV

Operador = Igor Ricardo

Dados Obtidos em 11/05/99 às 13:17:46

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
204.0	1.4	680.7	9.7	2271.1	0.3
237.2	3.5	791.3	8.5	2640.2	0.1
275.7	5.7	919.9	7.1	3069.4	0.0
320.5	7.8	1069.5	5.6	3568.3	0.0
372.6	9.3	1243.3	4.2	4148.4	0.0
433.2	10.3	1445.4	2.8	4822.7	0.0
503.6	10.7	1680.4	1.7	5606.6	0.0
585.5	10.4	1953.5	0.9	6518.0	0.0



Cumulants mean (Z Ave) 1153.2 Polidispersão 1.000

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633
 Temperatura = 25.0
 Ângulo = 90.0
 Equipamento = Autosizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 48
 Tipo de Análise = Contin
 Número de Pontos Ajustados = 18
 Razão de Espaçamento = 1.2
 Primeiro Ponto Utilizado = 85

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 0.890
 pH = N/A
 Índice de Refração do Dispersante = 1.331
 Índice de Refração da Amostra = 2.740
 Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 38.5
 Razão Sinal/Ruído = 25.0
 Erro do Ajuste = 0.0004
 Faixa de Análise = 100
 Pico 1: Diâmetro Médio = 652.0 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

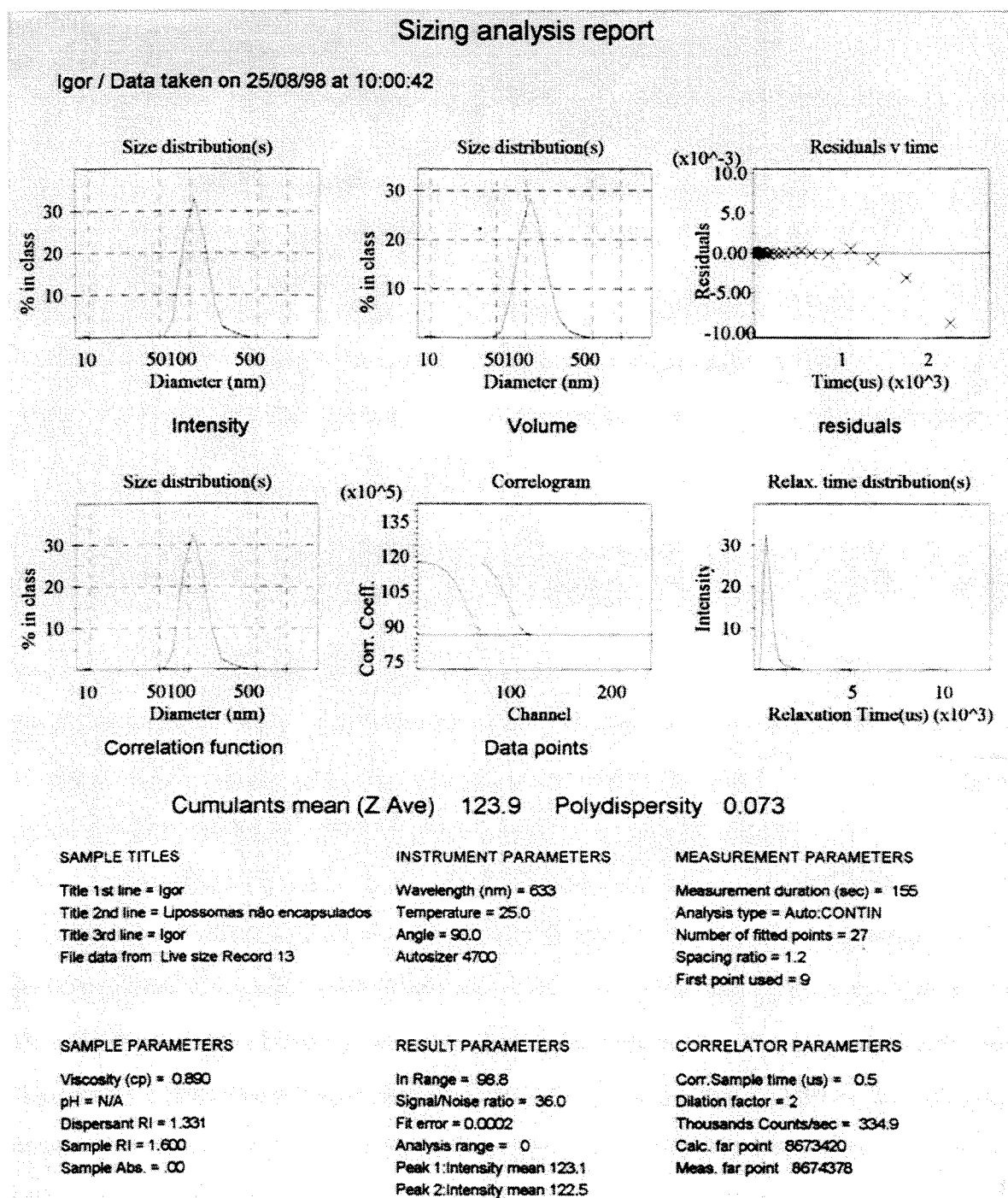
Tempo de Amostragem (us) = 0.5
 Fator de Diluição = 2
 Milhares de Contagens/s = 107.6
 Calc. far point 277608
 Meas. far point 342368

Estes Dados Foram Obtidos No Laboratório de Propriedades Coloidais e Reológicas
 DPB/FEQ/UNICAMP

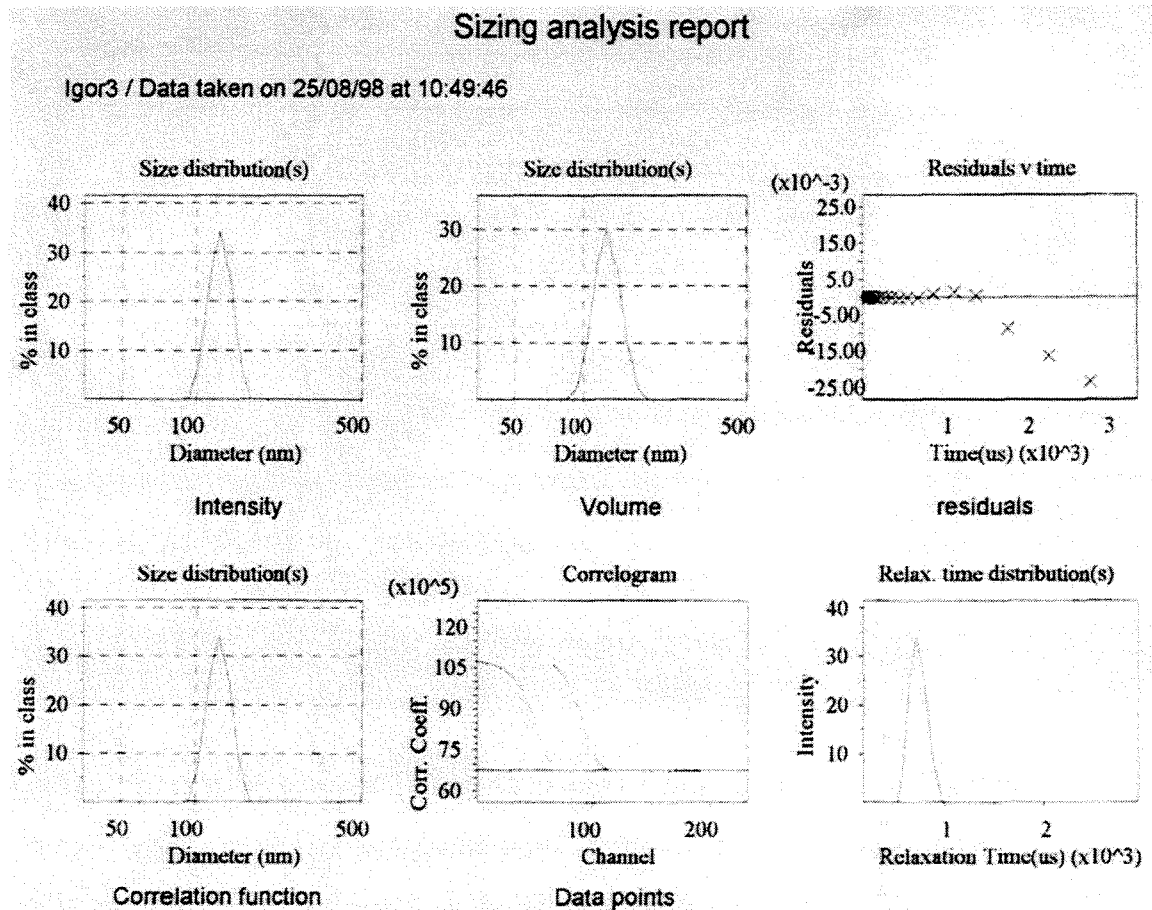
Este Relatório foi impresso em 11/05/99 às 13:18:15

Malvern Instruments Ltd, Malvern UK +44 1684 892456

4.6) Lipossomas Unilamelares Vazios



4.7) Lipossomas Unilamelares Encapsulando BSA (2,0 mg/mL)



Cumulants mean (Z Ave) 132.2 Polydispersity 0.076

SAMPLE TITLES

Title 1st line = Igor3
 Title 2nd line = Lipossomas encapsulando BSA
 Title 3rd line = Igor
 File data from Live size Record 17

INSTRUMENT PARAMETERS

Wavelength (nm) = 633
 Temperature = 25.0
 Angle = 90.0
 Autosizer 4700

MEASUREMENT PARAMETERS

Measurement duration (sec) = 272
 Analysis type = Auto:CONTIN
 Number of fitted points = 28
 Spacing ratio = 1.2
 First point used = 9

SAMPLE PARAMETERS

Viscosity (cp) = 0.890
 pH = N/A
 Dispersant RI = 1.331
 Sample RI = 1.600
 Sample Abs. = .00

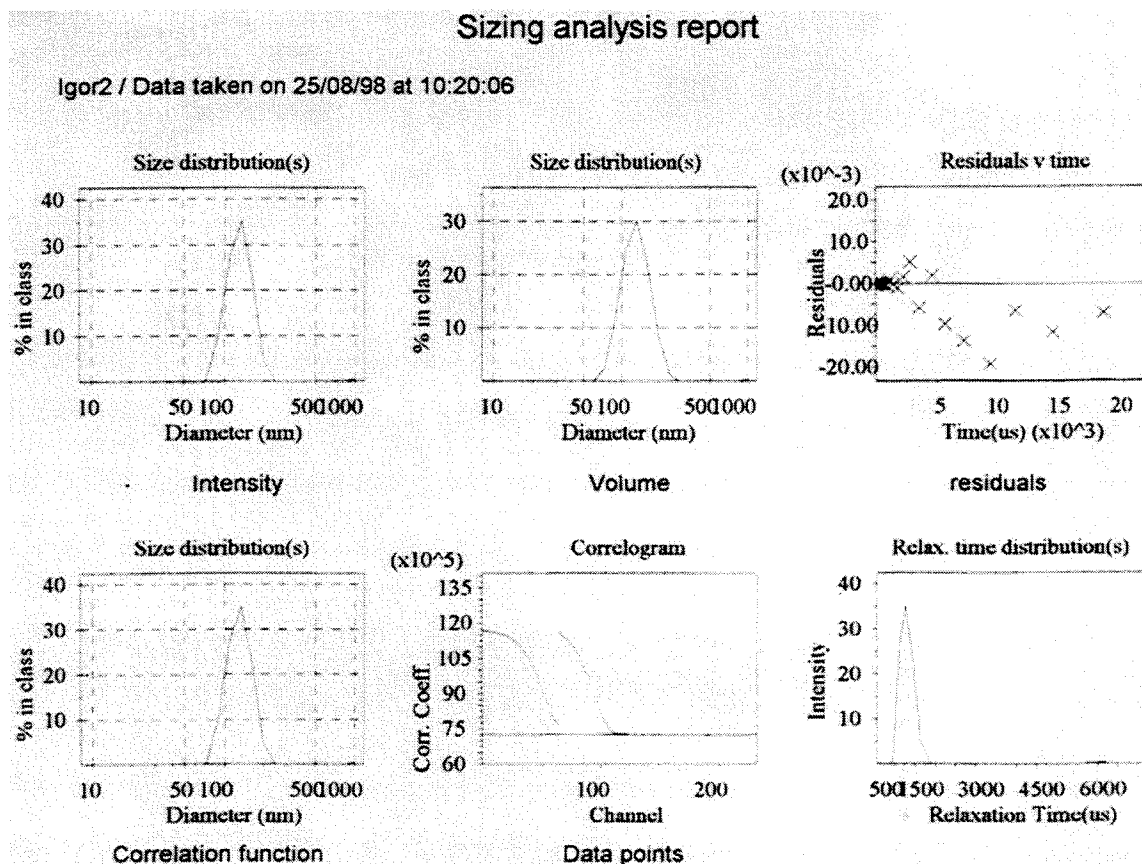
RESULT PARAMETERS

In Range = 91.0
 Signal/Noise ratio = 58.2
 Fit error = 0.0001
 Analysis range = 0
 Peak 1: Intensity mean 126.3
 Peak 2: Intensity mean 126.3

CORRELATOR PARAMETERS

Corr. Sample time (us) = 0.5
 Dilation factor = 2
 Thousands Counts/sec = 222.1
 Calc. far point 6713812
 Meas. far point 6777231

4.8) Lipossomas Unilamelares Encapsulando BSA (4,0 mg/mL)



Cumulants mean (Z Ave) 138.5 Polydispersity 0.129

SAMPLE TITLES

Title 1st line = Igor2
Title 2nd line = Lipossomas encapsulando BSA
Title 3rd line = Igor
File data from Live size Record 15

INSTRUMENT PARAMETERS

Wavelength (nm) = 633
Temperature = 25.0
Angle = 90.0
Autosizer 4700

MEASUREMENT PARAMETERS

Measurement duration (sec) = 258
Analysis type = Auto:CONTIN
Number of fitted points = 36
Spacing ratio = 1.2
First point used = 9

SAMPLE PARAMETERS

Viscosity (cp) = 0.890
pH = N/A
Dispersant RI = 1.331
Sample RI = 1.600
Sample Abs. = .00

RESULT PARAMETERS

In Range = 94.9
Signal/Noise ratio = 60.6
Fit error = 0.0001
Analysis range = 0
Peak 1: Intensity mean 131.6
Peak 2: Intensity mean 134.6

CORRELATOR PARAMETERS

Corr. Sample time (us) = 0.5
Dilation factor = 2
Thousands Counts/sec = 236.9
Calc. far point 7241977
Meas. far point 7264936

4.9) Lipossomas Unilamelares Encapsulando BSA (6,0 mg/mL)

Relatório de Análise de Tamanho de Partículas/Moléculas

Título da Amostra = igor4a

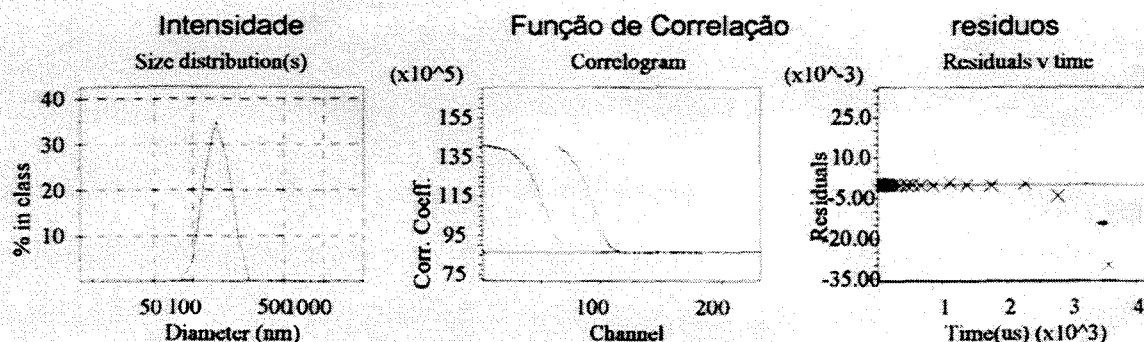
Descrição da Amostra = Lipossomas encapsulando BSA

Operador = Igor

Dados Obtidos em 17/09/98 às 14:31:21

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
16.5	0.3	82.1	0.0	407.4	0.0
20.2	0.0	100.3	5.0	497.7	0.0
24.7	0.0	122.5	23.4	608.1	0.0
30.2	0.0	149.7	35.1	742.9	0.0
36.9	0.0	182.9	26.8	907.6	0.0
45.0	0.0	223.5	9.4	1108.7	0.0
55.0	0.0	273.0	0.0	1354.5	0.0
67.2	0.0	333.5	0.0	1654.8	0.0



Cumulants mean (Z Ave) 165.5 Polidispersão 0.101

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633

Temperatura = 27.7

Ângulo = 90.0

Equipamento = Autosizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 140

Tipo de Análise = Auto:CONTIN

Número de Pontos Ajustados = 29

Razão de Espaçamento = 1.2

Primeiro Ponto Utilizado = 9

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 0.838

pH = N/A

Índice de Refração do Dispersante = 1.331

Índice de Refração da Amostra = 1.600

Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 99.4

Razão Sinal/Ruído = 63.2

Erro do Ajuste = 0.0001

Faixa de Análise = 0

Pico 1: Diâmetro Médio = 156.8 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

Tempo de Amostragem (us) = 0.5

Fator de Diluição = 2

Milhares de Contagens/s = 351.1

Calc. far point 8630710

Meas. far point 8630297

4.10) Lipossomas Unilamelares Encapsulando BSA (8,0 mg/mL)

Relatório de Análise de Tamanho de Partículas/Moléculas

Título da Amostra = igor4a

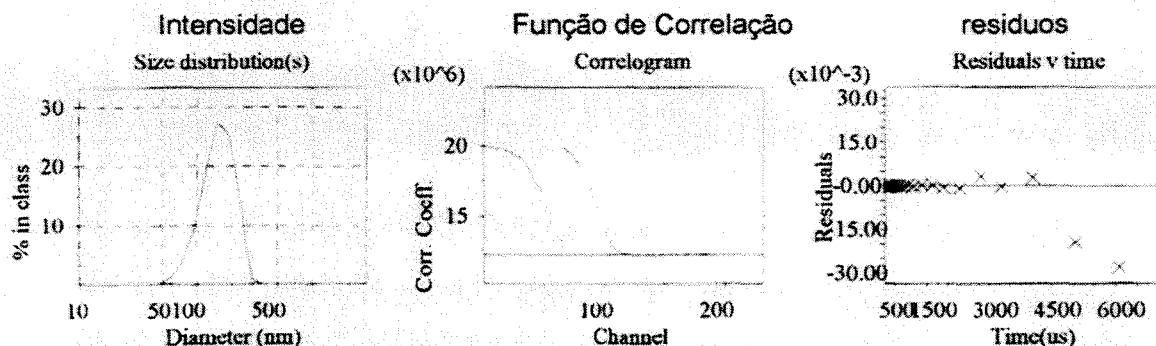
Descrição da Amostra = Lipossomas encapsulando BSA

Operador = Igor

Dados Obtidos em 17/09/98 às 14:42:18

Tabela de Dados de Tamanho medido (nm) e % de Intensidade

Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade	Tamanho	% Intensidade
11.7	0.0	74.1	3.7	467.8	0.0
14.8	0.0	93.3	8.7	588.9	0.0
18.6	0.0	117.4	18.8	741.5	0.0
23.4	0.0	147.8	27.5	933.6	0.0
29.5	0.0	186.1	25.6	1175.4	0.0
37.1	0.0	234.4	13.6	1479.9	0.0
46.7	0.0	295.1	1.0	1863.3	0.0
58.8	1.1	371.5	0.0	2346.0	0.0



Cumulants mean (Z Ave) 165.9 Polidispersão 0.166

PARÂMETROS DO INSTRUMENTO

Comprimento de Onda (nm) = 633
 Temperatura = 27.8
 Ângulo = 90.0
 Equipamento = Autosizer 4700

PARÂMETROS DE MEDIDA

Duração da Medida (s) = 200
 Tipo de Análise = Auto:CONTIN
 Número de Pontos Ajustados = 31
 Razão de Espaçamento = 1.2
 Primeiro Ponto Utilizado = 9

PARÂMETROS DA AMOSTRA

Viscosidade (cp) = 0.836
 pH = N/A
 Índice de Refração do Dispersante = 1.331
 Índice de Refração da Amostra = 1.600
 Absorbância da Amostra = .00

PARÂMETROS DOS RESULTADOS

Na Faixa = 98.6
 Razão Sinal/Ruído = 63.4
 Erro do Ajuste = 0.0001
 Faixa de Análise = 0
 Pico 1: Diâmetro Médio = 156.7 (nm)

PARÂMETROS DO CORRELADOR

Tempo de Amostragem (us) = 0.5
 Fator de Dilação = 2
 Milhares de Contagens/s = 349.4
 Calc. far point 12205691
 Meas. far point 12208879